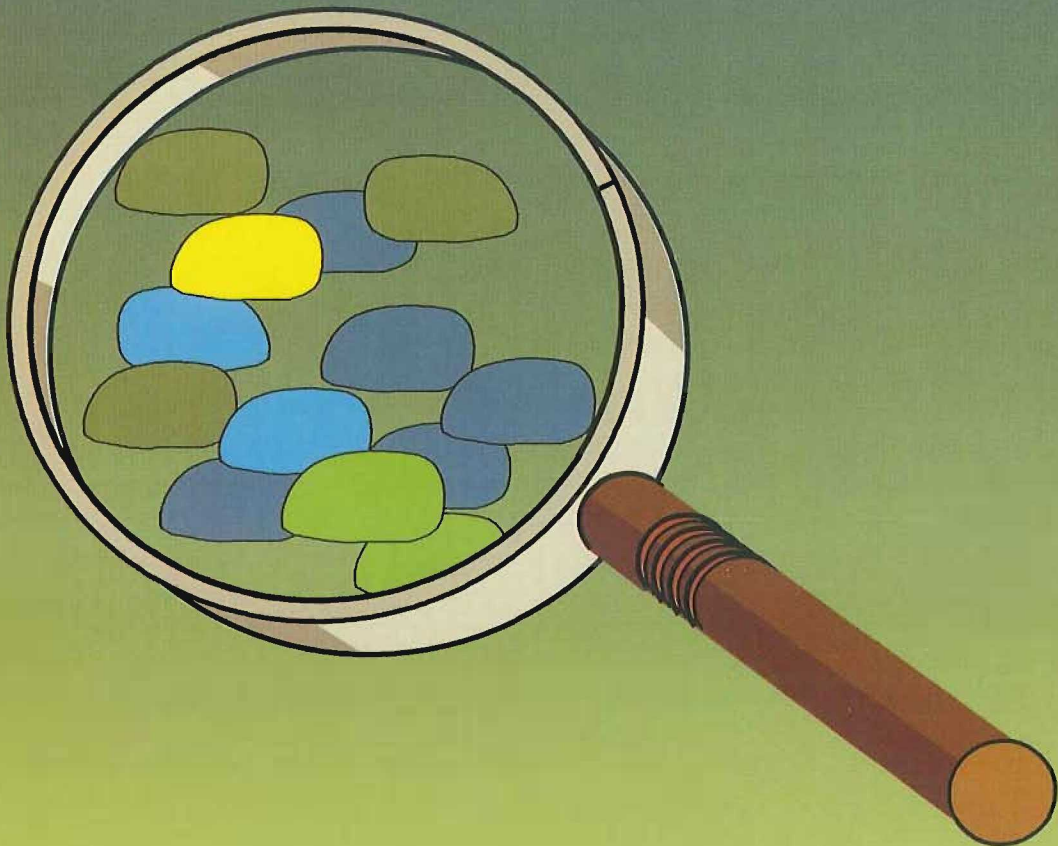




YMPÄRISTÖN-
SUOJELU

Katarina Björklöf

Merkkigeenien käyttö geeniteknisesti muunnettujen mikro- organismien seurantaan ympäristössä



Katarina Björklöf

Merkkigeenien käyttö
geeniteknisesti
muunnettujen
mikro-organismien
seurantaan ympäristössä

HELSINKI 1997



411 033

Kierrätykseen sopiva tuote
Alhaiset päästöt valmistuksessa

ISBN 952-11-0130-X
ISSN 1238-7312

Taiton ja kannen kuvan
toteutus: Katariina Kytönen

Oy Edita Ab
Helsinki 1997

Sisällys

1 Raportin lähtökonta ja tavoitteet	5
2 Mikrobiologisia tunnistusmenetelmiä	6
2.1 Viljelymenetelmät	6
2.2 Suorat menetelmät	7
3 Merkkigeeneiltä toivottuja ominaisuuksia	8
3.1 Spesifisyys	8
3.2 Liittäminen isäntäbakteeriin	8
3.3 Stabiilisuus	9
3.4 Signaalin voimakkuus	10
3.4.1 Säännöstelty ilmentyminen	11
3.5 Siirtymisen estäminen	12
4 DNA:n seuranta merkkigeenien avulla	14
4.1 Nukleiinihappojen eristäminen ympäristöstä	14
4.2 Koettimien käyttö	15
4.3 Polymerase chain reaction (PCR) -menetelmä	15
4.3.1 Kvantitatiivinen PCR	16
5 Mikrobitoiminnan seuranta merkkigeenien avulla	18
5.1 Antibioottiresistenssiä koodaavat merkkigeenit	18
5.1.1 Siirtokelvolliset antibioottiresistenssiä koodaavat merkkigeenit	19
5.1.2 Siirtokelvottomat antibioottiresistenssisyyttä koodaavat merkkigeenit	20
5.2 Myrkyllisten aineiden sietokykyä nostavat merkkigeenit	20
5.3 Muita valikoivia merkkigeenejä	21
5.4 Kolorimetriset merkkigeenit	22
5.4.1 lacZY	22
5.4.2 xylE	23
5.4.3 gusA	24
5.4.4 Muita kolorimetrisia merkkigeenejä	24
5.5 Jääkideaktiivinen merkkigeeni	25
5.6 Valoa tuottavat merkkigeenit	25
5.6.1 lux	26
5.6.2 luc	29
5.7 Fluoresenssiin perustuvat merkkigeenit	30
5.8 Fenotyyppiset merkkigeenit raportterigeeneinä ja ekotoksikologiassa	31
Hiivojen ja sienten tunnistaminen	32
Virusten tunnistaminen	34
Kehityksen suunta	35
Sanasto	37
Kiitokset	40
Sammanfattning	41

<i>Kirjallisuus</i>	43
<i>Kuvailulehdet</i>	54

Raportin lähtökohta ja tavoitteet

Geeniteknisesti muunnetut mikro-organismit (GMM) tarjoavat mielenkiintoisia sovellutuksia maataloudessa ja ympäristön suojelussa. Maataloudessa GMM:ja voidaan käyttää esimerkiksi tuhoeläinten biologisessa torjunnassa, kasvien kasvun edistämisessä ja ympäristöhuollossa saastumisen arvioimisessa sekä puhdistamisessa. Näissä sovelluksissa eläviä GMM:ja levitetään luontoon suorittamaan jotakin tarkkaan määriteltä tehtävää. Ennen GMM:ien käyttöä ympäristössä tulee kuitenkin arvioida tarkkaan ympäristölle tai ihmisen terveydelle mahdollisesti aiheutuvat riskit. Riskien hallitsemiseksi tulisi tutkimustyön edetä niin, että yksinkertaisista laboratoriokokeista siirrytään monimutkaisiin kenttäkokeisiin vasta, kun edellisen vaiheen riskien arviointi osoittaa riittävää turvallisuutta. Ympäristöön päästettyjen kantojen valvonnan tulee olla tehokasta, kunnes GMM:ien käyttäytymistä luonnossa pystytään ennalta arvioimaan. Riskin arvioimiseksi tarvitaan tehokkaita identifiointi-, kvantiointi- ja seurantamenetelmiä, joiden avulla voidaan selvittää GMM:ien levinneisyys ja käyttäytyminen ympäristöoloissa sekä niiden vaikutus muihin luonnon organismeihin (Gustafsson & Jansson, 1993). Tässä kirjallisuuskatsauksessa selvitetään, voidaanko mikro-organismien merkkigeenejä käyttää GMM:ien seurantaan ympäristössä. Lisäksi tarkastellaan, millä menetelmillä merkkigeenejä voidaan parhaiten havainnoida luonnossa ja verrataan eri merkkigeenien antamaa tietoa mikro-organismien aktiivisuudesta ympäristössä. Katsaus perustuu suurimmaksi osaksi 1990-luvulla kirjoitettuihin kansainvälisiin julkaisuihin. Lähes tuhannesta tiivistelmästä tutkittiin tarkemmin noin 300 kokonaista julkaisua. Mikro-organismien tunnistusmenetelmiä ja geenien siirtymistä luonnossa käsitellään tässä raportissa vain merkkigeenien näkökulmasta. Laajempi kuvaus löytyy Pitkäjärven (1996) raportissa.

Mikro-organismien laaja kirjo ja luonnossa vallitseva pienympäristöjen monimuotoisuus aiheuttavat sen, että valtaosaa luonnon mikrobeista ei voida eristää ja kasvattaa standardimenetelmillä laboratoriossa. Eristämällä DNA:ta metsämaasta ja tutkimalla sen vaihteluita arvioitiin maaperän bakteerikirjon olevan noin 200 kertaa suurempi kuin tähän asti on pystytty osoittamaan eristysmenetelmillä (Torsvik et al., 1990). Osa mikro-organismeista muuttuu luonnossa energiaa säästävään lepomuotoon. Tämä johtuu ympäristön ravinnepuutteesta tai epäedullisista fysikaalisista olosuhteista. Leposolut ovat eläviä ja aktivoituvat, kun olosuhteet muuttuvat suotuisiksi, mutta niitä ei voi kasvattaa laboratoriossa (Henis, 1987; Rozak & Colwell, 1987; van Elsas et al., 1991).

Myös luontoon lisätyt laboratoriokannat muuttuvat ajan myötä ei-kasvatettaviksi. Pedersen ja Leser (1992) osoittivat, että 90 % kasvien pinnoille lisätyistä bakteereista muuttui ei-kasvatettaviksi 24 tunnin kuluessa ja kahden viikon kulluttua määrä oli 99 %. Ravinneköyhässä viemäriveredessä vuoden ajan olleista soluista noin 10 % oli kasvatettavissa laboratoriossa (van Overbeek et al., 1990). Tämä hankaloittaa osaltaan GMM:ien seuranta luonnossa. Bioteknisten työvälineiden kehittyminen mahdollistaa lisättyjen solujen seurannan kirjavassa luonnon mikrobipopulaatiossa. Tunnistusmenetelmiä on useita ja ne kuvaavat mikro-organismeja eri tavoin. Yhdistelemällä useita menetelmiä saadaan luotettava kuva siitä, miten organismi käyttäytyy tietyssä ympäristössä (van Elsas et al., 1991).

Käytettäessä merkkigeenejä voidaan GMM:ja seurata joko laboratoriokasvatuksen avulla tai suoraan näytteestä. Bakteerin kasvatettavuus laboratoriossa osoittaa, että se on aktiivisessa muodossa ja että se sopeutuu helposti uuteen ympäristöön. Muunnettujen mikro-organismien vaikutus ympäristöön riippuu todennäköisesti myös niiden nopeasta kyvystä palautua epäsuotuisista olosuhteista. Jos GMM ei pysty aktivoitumaan yhtä nopeasti kuin muut ympäristössä olevat luonnolliset mikro-organismit, se ei pysty hyödyntämään lisättyjä ravinteita eikä näin lisääntymään. Tällainen kanta ei ilman valintapainetta pysty suorittamaan tehtävää, mihin se on suunniteltu (Prosser, 1994). Tutkimus GMM:ien vaikutuksista luonnon mikrobipopulaatioihin vaikeutuu, jos halutaan tutkia GMM:n vaikutusta kaikkiin näytteessä oleviin mikro-organismeihin. Silloin täytyy käyttää joko menetelmää, jolla organismit voidaan tutkia suoraan mikro-näytteestä tai epäsuoraa menetelmää, jossa seurataan muutoksia aineiden kiertokulussa tai solukomponenttien määrissä.

2.1 Viljelymenetelmät

Pesäkkeiden muodostus valikoivalla ravintomaljalla on yleisimpiä mikro-organismien tunnistus- ja kvantifointimenetelmiä. Koska menetelmä perustuu solun kykyyn jakautua ja muodostaa siten pesäkkeitä, se osoittaa vain osan todellisesta elävästä mikro-organismien määrästä. Menetelmän etuna on, että maljoilla kasvatettavien organismien määrä on helppo laskea. Jos tunnistettavalla kannalla ei

ole tehokasta selektiossa käytettävää merkkigeeniä, voivat sekaviljelmän nopea-
kasvuiset luonnonkannat estää tutkittavan kannan kasvua (Steffan et al., 1989)
tai peittää sen kasvuston maljalla, jolla kasvaa tiheästi bakteereita.

Monet sellaiset GMM:ien seurantamenetelmät, jotka perustuvat merkkigee-
nien ilmentämiseen, vaativat laboratoriokasvatusta merkkigeenien signaalien
havaitsemiseksi. Laboratoriokasvatukseen perustuvia, valintapainella osoitetta-
via merkkigeenejä ovat antibioottiresistenssiä koodaavat geenit, myrkyllisten ai-
neiden sietoa lisäävät geenit sekä jotkut metaboliset merkkigeenit. Kolorimetrisiä
tai bioluminointiin perustuvia merkkigeenejä tai *ina*- merkittyjä soluja ei voida
valikoivasti tunnistaa viljelmistä. Mikäli signaali on kuitenkin tarpeeksi vahva,
voidaan myös näitä kantoja määrittää joko kasvattamalla maljoilla tai MPN-me-
netelmillä.

Monet mikro-organismien identifiointimenetelmät (API, BIOLOG) perus-
tuvat kantojen aineenvaihduntaan, jolloin kannat kasvatetaan tarkoin määrätys-
sä kasvatusliuoksessa. Toiset identifiointimenetelmät perustuvat solurakenteiden
eroavuuksiin ja vaativat kannan kasvattamista ravintoliemessä ennen määritys-
tä. Proteiiniprofiileja, rasvahappoyhdistelmiä tai DNA:n osien pituuksia verrat-
taessa tarvitaan suuria solumääriä, joista kyseiset solukomponentit eristetään en-
nen identifiointia. Nämä identifiointimenetelmät ovat luotettavia, koska nämä
solukomponentit eivät yleensä muutu ympäristössä. Esimerkiksi viisi vuotta *Rhi-
zobium*- bakteerin maahan lisäyksen jälkeen kannan proteiini- ja DNA-kuviot oli-
vat muuttumattomia (Lindström et al., 1990). Tämän tyyppiset menetelmät eivät
pysty kuitenkaan erottamaan GMM:ja villityypisistä kannasta.

2.2 Suorat menetelmät

Mikro-organismien läsnäolo näytteessä voidaan havaita lisäämällä luonnonnäyt-
teeseen jokin helposti mitattava signaali, joka sitoutuu spesifisesti tutkittavaan
mikro-organismiin. Signaali voi olla vasta-aine (Ramos-González et al., 1992),
nukleiinihappo tai virus (Kodikara et al., 1991). Kun sitoutumaton signaali on
pesty pois, on signaalin voimakkuus näytteessä verrannollinen mikro-organis-
mien määrään. Mikro-organismien sitoutuminen erilaisiin pintoihin hankaloit-
taa signaalin pääsyä kosketuksiin mikro-organismien kanssa ympäristönäytteissä.
Signaali voi myös epäspesifisesti sitoutua kasvimateriaaliin tai maapartikkeleihin
ja aiheuttaa suuren taustan erityisesti maaperässä (Postma, 1988). Esimerkiksi *Sal-
monella*- ja *Bacillus*- bakteerien seuraaminen jätevedessä vasta-aineen avulla on-
nistui hyvin (Desmonts et al., 1990; Nybroe et al., 1992). Menetelmät, jotka tun-
nistavat mikro-organismit suoraan ympäristönäytteestä, eivät vaadi organismien
kasvattamista ja mittaavat myös kuolleet solut. Poikkeuksena tähän on biolumi-
nenssia aiheuttavaan merkkigeeniin perustuva tunnistusmenetelmä, joka mah-
dollistaa tietyn kannan biologisen toiminnan seuraamisen luonnossa.

3

Merkkigeeneiltä toivottuja ominaisuuksia

Yleensä GMM:t on muunnettu lisäämällä niiden genomiin tunnettu DNA:n osa. Näin syntyneitä uutta genotyyppiä on helppo seurata DNA-koettimella. Organismiin voidaan myös lisätä sellainen merkkigeeni, jota pystytään seuraamaan kannan uuden fenotyypin perusteella. Erillisen merkkigeenin tulisi tällöin olla teknisesti yksinkertainen ja herkästi, pienillä kustannuksilla tunnistettavissa. Merkkigeeniä ei saisi esiintyä tutkittavassa ympäristössä, eikä lisätty geeni saisi haitata isäntäsolun toimintaa. Merkkigeenin avulla tulisi voida tunnistaa GMM monimuotoisesta luonnonpopulaatiosta, määrittää merkittyjen solujen kokonaismäärä, erottaa elävät ja kuolleet solut toisistaan sekä määrittää populaation todellinen ja mahdollinen aktiivisuus luonnossa. Myös muunnetun DNA:n stabilisuutta ja geenien siirtymistä luonnon mikro-organismeihin tulisi pystyä seuraamaan (Wilson, 1995).

3.1 Spesifisyys

Jotta merkkigeeni todella kuvaisi kiinnostuksen kohteena olevaa mikro-organismia, on varmistuttava siitä, että virheellisiä negatiivisia tai positiivisia signaaleja ei määritetä (Ford & Olson, 1988). Jos olosuhteet ovat liian rajoittavat, merkkigeenin tuottamaa signaalia ei voida havaita, eikä GMM:ja voida määrittää. Toisaalta, jos merkkigeenin signaali ei tarpeeksi erotu ympäristöstä, saattaa määrittäminen antaa väärän positiivisen signaalin. Koska mikro-organismit usein ovat aktiivisia vain tietyssä ympäristössä, luonnon kannat eristetään usein samantyyppisestä ympäristöstä, jossa muunnettua organismia on tarkoitus käyttää. Tämä johtaa siihen, että luonnon näytteissä usein esiintyy sekä villityyppinen kanta tai sen lähisukulainen että GMM (Ford & Olson, 1988). Seurannan täytyy siksi pohjautua menetelmään, joka tunnistaa vain geeniteknisesti muunnetut yksilöt ja/tai niiden muunnetut geenisekvenssit (Prosser, 1994). Kantaan lisätty merkkigeeni pitäisi siksi olla eristetty eri ympäristöstä ja eri organismiryhmästä kuin GMM, ja leimaamisessa tulisi käyttää hyväksi ominaisuuksia, jotka eivät ole yleisiä luonnossa.

3.2 Liittäminen isäntäbakteeriin

Plasmidit ovat käyttökelpoisia työvälineitä geenien kloonauksessa. Niitä on helppo käyttää, koska monet plasmidit monistuvat useassa bakteerilajissa ja ne koodaavat usein valikoivia ominaisuuksia kuten antibioottiresistenttisyttä (de Lorenzo & Timmis, 1992). Merkkigeeni voidaan siirtää isäntäbakteeriin plasmidissa, joka monistuu itsenäisesti solussa. Plasmidin koko on usein huomattavan suuri verrattuna mikro-organismin koko perimään johtuen geenisekvensseistä, joita tarvitaan itsenäiseen monistukseen. Pienemmät plasmidit esiintyvät solussa suurina määrinä. Plasmidien ylläpito ja niiden geenien ilmentäminen voi aiheuttaa organismille aineenvaihdunnallisen taakan, joka näkyy huonontuneena kasvuna ja toimintana. Jo kahdenkymmenen kiloemäsparin kokoisen plasmidin lisäys soluun vähensi *Erwinia carotovora* -bakteerin ominaiskasvukykyä huomattavasti

(Grant et al., 1992) ja plasmidikoodatun merkkigeenin ilmentäminen *Pseudomonas fluorescens*-bakteerissa aiheutti ominaiskasvukyvyn pienenemisen 84 prosentilla (Amin-Hanjani et al., 1993). Gram-positiivisessa *Streptomyces*-kannassa todettiin, että plasmidin lisäys soluihin vähensi itiöiden määrää (Wipat et al., 1991). Toisaalta ei todettu huomattavia eroja, kun verrattiin plasmidia sisältäviä *P. putida*-kantoja villityyppiseen kantaan (Sobecky et al., 1992). Yhden havainnon mukaan (Devanas et al., 1986), suurikokoinen plasmidi ei aina heikentänyt kannan kolonisaatiokykyä.

Transposonivektorien avulla merkkigeenejä voidaan liittää suoraan isäntäbakteerin kromosomiin (Herrero et al., 1990; de Lorenzo et al., 1990). Transposonivektorit ovat plasmideja, joihin merkkigeeni on lisätty osana transposonia. Plasmidit on valittu niin, etteivät ne pysty monistumaan isäntä-organismissa, vaan häviävät soluista. Transposoni pystyy sitä ennen siirtämään itsensä ja merkkigeenin isäntäkromosomiin koodaamallaan transposaasi-entsyymillä. Siirretyt geenit sijoittuvat perimässä sattumanvaraisesti ja useimmiten isäntään siirtyy vain yksi kopio (Herrero et al., 1990). Jos merkkigeeni joutuu genomissa kohtaan, joka koodaa solulle välttämätöntä proteiinia, voi mikro-organismin kasvu heikentyä.

Homologista rekombinaatiota hyödyntäen voidaan merkkigeeni liittää isäntäbakteerin genomissa tarkkaan tunnettuun kohtaan (Ruvkun & Ausubel, 1981). Menetelmän edellytys on, että isäntäbakteerista voidaan siirtää lyhyt pala kromosomia plasmidivektoriin, johon merkkigeeni lisätään keskelle isäntäbakteerin DNA:ta. Kun plasmidivektori siirretään takaisin isäntäbakteeriin, isännän omat entsyymit saavat aikaan kaksinkertaisen homologisen rekombinaation, joka vaihtaa osan villityyppisestä genomista vektorin homologiseen osaan. Ylimääräisiä geenisekvenssejä ei siirry merkkigeenin mukana. Vaikka homologisen rekombinaation periaate on tunnettu jo pitkään, on menetelmää käytetty vain vähän mikrobien leimaamiseen merkkigeeneillä. Tämä johtuu siitä, että menetelmä on monimutkaisempi kuin yllä mainitut menetelmät ja vaikea toteuttaa (de Lorenzo & Timmis, 1992). Menetelmää on kuitenkin onnistuneesti sovellettu ainakin *P. fluorescens*- ja *Rhizobium meliloti*-bakteereissa (van Elsas & Waalwijk, 1991; Hwang & Farrand, 1994; Selbitsch et al., 1995).

Plasmidien käyttö merkkigeenien liittämiseksi isäntäbakteeriin on vähentynyt varsinkin sovellutuksissa, jossa GMM tullaan käyttämään avoimessa ympäristössä. Plasmidin käyttöä haittaavat useat tekijät, kuten kolonisaatiokyvyn heikkeneminen, lisättyjen ominaisuuksien epästabiilisuus ja plasmideissa usein luonnostaan esiintyvät antibioottiresistenssigeenit. Transposonivektoreita sensijaan kehitetään toimiviksi hyvin erilaisissa bakteerilajeissa ja niitä käytetään yleisesti. Kloonauksessa käytetään usein muita valikoivia merkkigeenejä kuin antibioottiresistenssigeenejä (Herrero et al., 1990; Saint et al., 1995).

3.3 Stabiilisuus

Merkkigeenin pysyvyys solussa vaihtelee riippuen käytetystä liittämismenetelmästä. Plasmidien aiheuttaman taakan vuoksi monet plasmidit eivät ole stabiileja GMM:n jakautuessa, jos valintapaineita plasmidissa sijaitsevien ominaisuuksien suhteen ei ole. Plasmidin häviäminen maahan siirretyn *Rhizobium*-bakteerin genomista oli 15 päivän jälkeen 70 prosenttia ja *Pseudomonas*-bakteerin genomista kuuden päivän jälkeen jopa 90 prosenttia (Cresswell et al., 1994; deWeger et al., 1991), kun taas *Enterobacter cloacae*-bakteerin plasmidi säilyi kahden viikon aikana 82 prosentissa soluista (Fravel et al., 1990). Kromosomaalisesti merkitty *P. fluorescens*-kanta säilyi muuttumattomana 200 sukupolven ajan jatkuvassa viljelmässä, mutta plasmidiin sijoitettu merkkigeeni hävisi puolesta solumäärästä noin 11,5

sukupolvessa (Amin-Hanjani et al., 1993). Lisättäessä ympäristöön pienempiä määriä bakteereita, häviäminen oli suurempaa johtuen lisääntyneestä kasvusta jonka aikana plasmidi segregoitui solusta pois (Winstanley et al., 1991).

Myös Gram-positiivisella *Bacillus* -kannalla on osoitettu plasmidin häviävän 30 sukupolven jälkeen solusta, kun valintapainetta plasmidille ei ollut tai kun solut itiöivät. Kromosomiin lisätty geeni oli stabiili itiöinnin aikana ja myös sen jälkeen (Cook et al., 1993). Makeassa vedessä auksotrofisten ja prototrofisten *P. putida*-kantojen segregatio-ominaisuutta verrattaessa todettiin, että auksotrofisilla bakteereilla tapahtui plasmidi-segregaatiota. Kuuden tunnin jälkeen vain 12 prosenttia populaatiosta kykeni ilmaisemaan plasmidia. Prototrofisissa kannoissa plasmidi pysyi vakaana (Sobecky et al., 1992). Pidettäessä *Pseudomonas*-bakteeria vuoden ajan ravinneköyhässä viemäriveredessä, oli plasmidin häviäminen nopeampaa kuin *Klebsiella*-bakteerissa (van Overbeek et al., 1990).

Häviäminen näyttää siis olevan riippuvaista sekä bakteerikannoista että plasmidista. Luonnossa ja jatkuvassa viljelyssä plasmidit voivat selviytyä ilman valintapainetta. Arvellaankin, että pitkäaikaisen kasvatuksen aikana kanta voi korjata plasmidin ylläpitoa vaativan haitan kromosomaalisilla mutaatioilla tai deleetio-mutaatioilla, jotka pienentävät plasmidin kokoa (Caulcott et al., 1987, Godwin & Slater, 1979). Ominaiskasvukyvyn kasvua on pystytty osoittamaan neljästä tutkitusta kolmessa *P. putida*-kannasta, bakteereiden oltua yli kaksi viikkoa järvivedessä (Sobecky et al., 1992).

Jos merkkigeeni on siirretty transposonin avulla isännän genomiin, on vaara että transposoni aktivoituu uudestaan GMM:ssa ja siirtyy GMM:n genomissa. Tästä syystä on kehitetty vaurioitunut transposoni, jossa transposaasigeeni on siirretty pois insertiosekvenssien välistä. Näin transposaasigeeni ei siirry merkkigeenin mukana isäntägenomiin, eikä merkkigeeni pysty uudestaan siirtymään transposonin avulla (Berg et al., 1989). Mini-*Tn5*-vektorin avulla liitetty merkkigeeni oli stabiili *Rhizobium meliloti*-kannassa 60 sukupolven ajan nesteviljelmässä ja vielä kahden kuukauden jälkeen kaikki maasta tutkitut kloonit sisälsivät merkkigeenin (Cebolla et al., 1993). *Pseudomonas aeruginosa* ilmensi nesteviljelmässä antibioottiresistenssiä, valon tuottoa ja β -galaktosidaasin tuottoa ainakin vuoden ajan. Maassa fenotyyppi säilyi yli kahdeksan viikkoa (Flemming et al., 1994a).

Transposoni-vektoreiden avulla tapahtuvassa insertiossa myös lyhyet toistuvat insertiosekvenssit siirtyvät merkkigeenin kanssa isäntäkromosomiin. Jos GMM:iin siirtyy luonnollinen transposoni ympäristöstä, jonka transposaasi pystyy aktivoimaan insertiosekvenssejä uudestaan, on olemassa pieni riski, että merkkigeeni liikkuu GMM:n genomissa. Homologisella rekombinaatiolla voidaan isäntään siirtää merkkigeeni ilman tarpeettomien vektori-DNA:n osien siirtymistä soluun. Muunnettu geeni on silloin genomissa yhtä stabiili kuin muut isäntäbakteerin geenit. Siksi perinnöllisesti turvallisin menetelmä on käyttää homologisella rekombinaatiolla liitettyä merkkigeneä (van Elsas & Waalwijk, 1991).

3.4 Signaalin voimakkuus

Merkkigeenin ilmentyminen pitäisi olla tarpeeksi tehokasta, jotta pienet solumäärät voidaan erottaa ympäristöstä, jossa on paljon luonnon mikro-organismeja. Sen pitäisi olla kuitenkin niin vähäistä, ettei solulle aiheuteta haittaa, joka näkyy kasvunopeuden pienenemisenä (Lampinen et al., 1992; Cebolla et al. 1995). Merkkigeenin genotyyppinen signaali riippuu pelkästään näytteessä olevasta geenikopioiden määrästä, mutta fenotyyppinen signaali riippuu myös geenin ilmentämistasosta eli proteiinituotteen muodostuksen tehokkuudesta. Määrittämissuomen ympäristö 104

Merkkigeenin genotyyppistä ja fenotyyppistä signaalia voidaan tehostaa liittämällä useampi geenikopio soluun. Plasmidiin sijoitettuna merkkigeeni on läsnä yhtä monena kopiona kuin vektoriplasmidikin. Kun verrattiin kromosomiin tai plasmidiin asennettujen merkkigeenien signaalien voimakkuutta juuristossa kasvavissa *Pseudomonas*- bakteereissa todettiin, että autoradiografian määrittämisraja plasmidimerkitylle kannalle oli 10^4 pmy senttimetrissä juurta. Määrittämisraja oli kymmenen kertaa korkeampi sellaisella kannalla, jossa merkkigeeni oli kromosomissa (de Weger et al., 1991). *P. fluorescens*- soluissa valon tuotto oli tehokkaampi silloin, kun merkkigeeni sijaitsi plasmidissa verrattuna kromosomaalisesti merkittyihin soluihin (Amin-Hanjani et al., 1993). Kun verrattiin plasmidiin ja kromosomiin asennettujen merkkigeenien signaalien voimakkuuksia Gram-positiivisissa *B. subtilis*- kannoissa todettiin, että plasmidissa koodatun geenin signaali oli voimakkaampi (Cook et al., 1993). Valoa tuottavan merkkigeenin signaali *R. meliloti*- kannassa voimistui 10-15-kertaiseksi kun geeni asennettiin plasmidiin, jonka kopioluku oli noin kymmenen kappaletta solua kohden (Cebolla et al., 1993).

Merkkigeenin fenotyyppistä ilmenemistä voidaan parantaa asettamalla geenin eteen mahdollisimman tehokas promoottorisekvenssi. *Anabaena*- syanobakteerissa plasmidiin asennetun merkkigeenin ilmeneminen vaihteli 10^4 - kertaisesti riippuen promoottorista (Shmetterer et al., 1986). *E. coli*- bakteerin ribosomaalista RNA- promoottoria käytettäessä, kromosomaalisen merkkigeenin voimakkuus lisääntyi 100-1500 kertaiseksi verrattuna *neo*- tai *lac*- geenien promoottoreihin. Laboratorio-olosuhteissa promoottoreiden tehokkuus oli riippuvainen käytetyistä ravinteista (Bennerova & Crowley, 1994). Cebolla et al., (1995) vertasivat *P1*-, *P_R*- ja *P_{trc}*- promoottorien voimakkuuksia eri bakteerilajeissa. *P1*-promoottori oli heikoin *Agrobacterium tumefaciens*-, *P. putida*-, *E. coli*-, ja *R. meliloti*- kannoissa, joissa *P_{trc}*- promoottori oli tehokkain. Yhdistelemällä eri promoottorisekvenssejä aikaansaatiin synteettinen promoottori, joka *tac*-promoottoriin verrattuna oli kaksi kertaa tehokkaampi *E. coli*:ssa ja kymmenen kertaa tehokkaampi *Rhizobium*:issa (Giacomini et al., 1994).

Hyvin pienet määrät GMM:ia ja sellaiset GMM:t, jotka ovat pidemmän ajan kuluessa muuttuneet ympäristössä leposoluiksi, voidaan havaita näytteistä, jos ne ensin elvytetään laboratoriossa lisäämällä näytteeseen ravinteita ja muuttamalla fysikaalisia olosuhteita kasvua edistäviksi. Näin heikkojakin signaaleja voidaan tehostaa ja siten osoittaa mikro-organismien läsnäolo näytteessä. Johtopäätöksiä organismin määrästä tai toiminnasta ympäristöoloissa ei voida tehdä. Elvytyistä hyväksikäyttäen pieni määrä valoa tuottavia soluja pystyttiin havaitsemaan neljän kuukauden jälkeen juurten pinnalla ja kolmen kuukauden jälkeen lehtien pinnalla (Dane & Shaw, 1994).

3.4.1 Säännöstellty ilmentyminen

Merkkigeenien vaikutus organismiin riippuu siitä, miten tehokkaasti geeniä luetaan sekä miten aktiivisesti geenituote toimii solussa (Amin-Hanjani et al., 1993). Jos käytetään säädeltävää promoottoria, geenituotteen muodostus voidaan aloittaa aineen lisäyksellä tai lämpötilan muutoksella niin, ettei geenituotetta muodostu ennen määrittystä. Näin mikro-organisme ei ympäristössä tuhlaa energiaansa tuottamalla merkkigeenin koodaamaa ylimääräistä entsyymia ja geeni aiheuttaa GMM:lle pienemmän aineenvaihdunnallisen taakan kuin jatkuva proteiinin valmistus. *P. aeruginosa*- soluissa on käytetty λ -bakteriofaagin lämpösäädeltäviä promoottoreita *pL* ja *pR xylE* -merkkigeenin säätelyyn. Silloin huomattiin, että kanta, joka sisälsi säädeltävän merkkigeenin, oli vakaampi nesteviljelmässä kuin kanta, jonka promoottori aiheutti jatkuvan proteiinin tuoton (Winstanley et al., 1991). Toisaalta kantojen välillä ei ollut eroja niiden elonjäämisessä järvive-

dessä. Geenin ilmentymistä voidaan vastaavalla tavalla säätää myös niin, että proteiinituotetta syntyy vain tietyssä ympäristössä. Tämä vaatii promootorin aktivoitumisen substraattilla, joka on tietylle ympäristölle tunnusomainen. Näitä ovat esimerkiksi jotkut juuristossa tuotetut aineet (van Overbeek & van Elsas, 1995).

Jos solusta puuttuu substraatti merkkigeenin tuottamalle entsyymille, entsyymi ei toimi solussa, vaikka merkkigeeni tuottaakin sitä. Näin solulle ylimääräinen entsyymi ei kuluta tärkeää energiaa. Valoa tuottavat merkkigeenit käyttävät substraattinaan monimutkaisia molekyylejä, joita solut itse tuottavat. Jos GMM:lta poistetaan substraattia koodaavat geenit, valon tuottoa ei tapahdu ilman substraatin ulkopuolista lisäystä ja haittavaikutukset solulle pienenevät (Amin-Hanjani et al., 1993; Möller, 1994).

Vaikka säännöstelty ilmentyminen on usein arveltu hyväksi tavaksi parantaa GMM:n kolonisaatiokykyä ympäristössä, menetelmä voi haitata määrittämiä, jossa GMM:n toimintaa todellisessa ympäristössä halutaan tutkia. Käyttämällä merkkigeenejä, joiden koodaamien proteiinituotteiden substraatteja on saatavilla ja joita ilmennetään ympäristössä, voidaan mikro-organismien todellista, senhetkistä toimintaa määrittää ilman eristymiä, uuttoja tai lisäyksiä.

3.5 Siirtymisen estäminen

Jotta GMM:ien vaikutus luonnon mikrobistoon olisi mahdollisemman pieni, tulisi muunnettujen geenien siirtymistä minimoida luonnossa. Jos geeni siirtyy luonnon mikro-organismeihin, se voi jäädä pidemmäksi ajaksi ympäristöön kuin GMM. Tämä vaikeuttaa geeniteknisesti muunnetun geenin valvontaa. Suurin osa mikrobeihin siirtyneistä geeneistä ei todennäköisesti hyödytä solua, vaan geeni häviää populaatiosta. On kuitenkin mahdollista, että muodostuu uusia, kilpailukykyisiä geeniyhdistelmiä, joita muutoin ei luonnossa syntyisi. Tämä voi johtaa uusiin tai tehokampiin tuhoeläimiin ja -kasveihin tai mikrobipopulaatioiden muuttumiseen siten, että luonnon alkuainekierrat häiriintyvät (Tiedje, 1987). Koska GMM:ia on usein vaikeaa pitää toimivina ympäristössä, on eräissä sovellutuksissa ehdotettu, että geeniteknisesti muunnettuja geenejä siirrettäisiin plasmidien avulla suoraan kohdeympäristön mikro-organismeihin, jotka valmiiksi ympäristöön sopeutuneina voisivat tehokkaammin suorittaa tietyn kemiallisen reaktion ympäristössä, jossa valintapaine on suuri.

Geenien siirtymisfrekvenssi luonnossa on yleensä pieni, mikä johtuu eri lajeille ominaisista restriktioentsyymeistä ja esteistä muodostaa konjugaatiosiltoja, sekä bakteerien kyvyttömyydestä monistaa lajille tuntemattomia geenejä (Porter, 1990). Luonnossa geenien siirtymistä tapahtuu ensisijaisesti sellaisessa ympäristössä, jossa mikro-organismien pitoisuudet ja ravintomäärät ovat suuret. Näitä ympäristöjä ovat esimerkiksi kasvien juuristo (van Elsas et al., 1988; Lilley et al., 1994) ja vihreiden osien pinnat (Powell et al., 1993; Björklöf et al., 1995), suolisto (Scott & Flint, 1995), biofilmit (Hill et al., 1994), sedimentit (Sandaa & Enger, 1994) ja jätevesi (Gealt et al., 1985; Lebaron et al., 1994). Vaikka geeninsirrot ovat aktiivisia, energiaa kuluttavia tapahtumia, on niitä raportoitu tapahtuvan myös useassa vähäravinteisessa ympäristössä, kuten juoma- ja merivedessä, joissa bakteeripitoisuudet ovat pieniä (Sandt & Herson, 1991; Goodman et al., 1993; Sörensen, 1993).

Merkkigeenin siirtymisen riski GMM:sta luonnon mikrobeihin vaihtelee riippuen käytetystä liittämismenetelmästä. Eniten on tutkittu geenien siirtymistä konjugatiivisten plasmidien avulla. Useat konjugatiiviset plasmidit monistuvat hyvin monessa eri bakteerilajissa. Esimerkiksi monet *IncQ*-, *IncP*- ja *IncW*-ryhmän plasmidit monistuvat useimmissa Gram-negatiivisissa bakteereissa. Geenin siir-

tymistä on myös havaittu Gram-negatiivisten ja Gram-positiivisten välillä (Courvalin, 1994) sekä bakteereista sieniin ja kasveihin (Woerse, 1987). Vaikka konjugatiivisten plasmidien käyttöä luonnossa vältetään niiden suuren siirtymisriskin takia, luonnolliset konjugatiiviset plasmidit voivat siirtyä ympäristössä GMM:iin. Plasmidin siirtyessä GMM:sta uuteen vastaanottajasoluun on olemassa riski, että myös merkkigeeni siirtyy plasmidin mukana. Ei-konjugatiiviseen plasmidiin tai kromosomiin sijoitetut merkkigeenit voivat myös pienellä todennäköisyydellä siirtyä muihin mikro-organismeihin plasmidien välityksellä. Osa ei-konjugatiivisista plasmideista sisältää *mob*-geenejä, jotka laboratorio-oloissa saavat aikaan niiden samanaikaisen siirtymisen konjugatiivisen plasmidin kanssa (Sandt & Herson, 1991; Lebaron et al., 1994; Hill et al., 1994). Eräät konjugatiiviset plasmidit siirtävät osan kromosomista mukanaan vastaanottavaan soluun (Porter, 1991). Kun GMM:n kromosomiin lisättiin *mob*-geeni, todennäköisyys, että *IncP1*-ryhmän konjugatiivinen plasmidi siirtäisi *lacZY*-merkkigeeniä samaa bakteerikantaa olevaan vastaanottajaan, oli yksi joka 10^6 - 10^7 vastaanottajasolua kohti (Fedi et al., 1996). On myös havaittu, että *IncP*-plasmidin konjugoituaessa voi vastaanottajasolusta siirtyä kromosomaalisia geenejä luovuttajasoluun sekä konjugaatiossa saman lajin sisällä että eri lajien välisessä konjugaatiossa (Mergeay et al., 1987). Toisaalta ei ole voitu osoittaa kolmen, kromosomissa etäällä toisistaan sijoitetun merkkigeenin siirtymistä toisiin mikrobeihin kasvien juuristossa tai lehdillä (Bailey et al., 1995).

Kuolleista GMM:sta vapautuva DNA voi siirtyä luonnon mikrobeihin transformaation avulla. Myös jotkut bakteerilajit voivat aktiivisesti luovuttaa kromosomaalista ja plasmidi-DNA:ta (Lorenz et al., 1991). Vapaa plasmidi-DNA säilyi maassa useita viikkoja ja biologisesti toimivia plasmideja voitiin eristää 60 päivää lisäyksen jälkeen (Romanowski et al., 1993). Vapaan DNA:n stabiilisuutta voidaan osittain selittää sillä, että se maassa kiinnittyi hiekkaan, joka suojaa DNA:ta nukleasientsyymien pilkkomiselta (Lorenz et al., 1992). Merivedessä kymmenen prosenttia luonnon kannoista pystyi vastaanottamaan ja ilmentämään lisättyä plasmidi-DNA:ta ja 14 prosenttia ilmensi lisättyä homologista kromosomaalista DNA:ta (Frischer et al., 1994). Merestä eristetty *Vibrio*-kanta vastaanotti homologista kromosomi-DNA:ta tehokkaammin kuin plasmidi-DNA:ta (Frischer et al., 1990). Pohjaveden hiekkaan tarttunut kromosomaalinen DNA siirtyi vastaanottajakantaan yhtä tehokkaasti kuin vapaa DNA (Chamier et al., 1993).

Transduktion avulla bakteriofaagin on osoitettu siirtävän geenejä bakteerista toiseen. Siirrettävät geenit voivat olla joko plasmidi- tai kromosomaalista-DNA:ta, mutta proteiiniuoren rajoitetun koon takia vain muutama prosentti bakteerien perimästä siirtyy (Kokjohn, 1989). Lisäksi bakteriofaagit ovat hyvin lajispesifiä ja pystyvät siksi siirtämään DNA:ta vain lähisukuisten bakteerien välillä. Makeassa vedessä transduktion avulla kromosomaalinen ja plasmidi-DNA siirtyi samalla frekvenssillä (Saye 1987; 1990). Transduktiota on osoitettu tapahtuvan myös kosteilla kasvien pinnoilla (Kibambi et al., 1994).

Luonnossa esiintyy niin monenlaisia geeninsiirtotapoja, että riskiä muunnettujen geenien siirtymiselle lieenee vaikea välttää. Myös kromosomaalinen DNA voi siirtyä luonnossa, mutta vastaanottajasoluissa on oltava homologinen osa DNA:ta, jotta siirretty DNA sulautuisi genomiin ja pysyisi solussa. Siirtymisen riski varsinkin kromosomaalisesti merkittyjen geenien kohdalla ei ole suuri, mutta riski kasvaa, kun suuria määriä bakteereita päästetään ympäristöön (Gustafsson & Jansson, 1993). Erilaisia itsemurhageenejä on valmisteilla muokattujen geenien toiminnan estämiseksi GMM:n ulkopuolella (Atlas, 1992; Jensen et al., 1993) tai koko GMM:n inaktivoitumiseksi tarkoitusalueen ulkopuolella (Contreras et al., 1991). On kuitenkin ensisijaisen tärkeää, että GMM tunnetaan mahdollisimman tarkasti, eikä haitallisia geenejä käytetä, jotta ympäristöriski saadaan minimoitua.

Geeniteknisesti muunnetun mikro-organismin sisältämän perimäaineksen kohdalla ympäristössä voidaan tutkia käyttäen hyväksi organismille ominaista DNA-sekvenssiä. Tämä voi olla osa organismin geenitekniikalla muunnettua geeniä, fenotyyppinen merkkigeeni, jota seurataan genotyyppisesti tai erikseen lisätty genotyyppinen merkkigeeni, jota solu ei ilmennä. Määrittämällä tietyn DNA-sekvenssin määrää luonnossa saadaan tietoa solujen kokonaismäärästä, mutta myös kuolleiden solujen vapautunut tai muihin organismeihin siirtynyt DNA mitataan. Siksi genotyyppisellä määrityksellä ei voida suoraan tutkia kantojen biologista aktiivisuutta luonnossa. Tietyn geenin aktiivisuutta luonnossa voidaan tutkia myös epäsuorasti määrittämällä, miten paljon muunnetulle geenille ominaista RNA:ta näyte sisältää (Pichard & Paul, 1991).

Fenotyyppisestä merkkigeenianalyysistä poiketen genotyyppisessä analyysissä uutetaan DNA tai RNA näytteestä, jonka jälkeen tutkittava geeni havainnoidaan leimattujen koettimien avulla tai monistamalla PCR:llä. Molekyylibiologiset määritykset nostavat tutkimuksen hintaa, koska ne vaativat usein epäpuhtauksien tarkan poiston, entsyymikäsittelyä sekä sekvenssitietoa tutkittavasta geenistä.

4.1 Nukleiinihappojen eristäminen ympäristöstä

Nukleiinihappoja voidaan eristää ympäristöstä joko eristämällä mikro-organismit ennen nukleiinihappojen uuttamista tai uuttamalla nukleiinihapot suoraan näytteestä. Vesinäytteistä DNA:n uutto on yleensä helppo, mutta maa- ja sedimenttinäytteissä ongelmia muodostuu humusaineista ja savipartikkeleista (Bej et al., 1990; Steffan & Atlas, 1991). Kaiken DNA:n ei uskota vapautuvan nykyisin käytetyillä menetelmillä (Stahl & Kane, 1992). DNA-saannot olivat jopa 70 kertaa suuremmat suoralla uutolla maasta ja sedimenteistä verrattuna menetelmään, jossa mikro-organismit eristettiin näytteestä ennen uuttamista. Näytteissä esiintyi kuitenkin enemmän epäpuhtauksia (Steffan et al., 1988). Humusaineiden on todettu estävän PCR-reaktioissa käytettävää *Taq*-polymeraasin toimintaa (Tsai & Olson, 1992), DNA-DNA-hybridisaatiota, DNA:n pilkkomista restriktioentsyymeillä sekä puhdistetun DNA:n transformaatiota (Tebbe & Vahjen, 1993). Myös savimineraalit estävät joidenkin restriktioentsyymien toiminnan. Orgaanisia aineita pystytään poistamaan näytteistä polyvinyylipyrrolidonin (PVPP) avulla ilman DNA-saannon huononemista. Fraktioihin jaetun DNA:n kalvolle siirtämisessä ja PCR-määrityksessä on nukleiinihapon oltava erittäin puhdas. Nestemäisen näytteen ja pesäkkeiden suora hybridisaatio sallivat enemmän epäpuhtauksia (Steffan et al., 1989; van Elsas & Waalwijk, 1991; van Elsas et al., 1991). Vaikka menetelmiä DNA:n uuttamiseksi maasta ja sedimentistä kehitellään jatkuvasti (Pillai et al., 1991; Dijkmans et al., 1993; Moré et al., 1994; Watson et al., 1995), ovat ympäristöstä peräisin olevat inhiboivat aineet edelleen ongelma tutkittaessa kooltaan pieniä bakteeripopulaatioita (Watson et al., 1995). Puhdistusmenetelmän optimointiin vaikuttavat maaperän laatu, eristettävä nukleiinihappo ja mikro-organismi, josta nukleiinihappo eristetään (Henschke et al., 1991; Dijkmans et al., 1993; Leser, 1995).

Genotyyppisessä seurannassa ympäristön yhdisteet haittaavat määrittämiä sitomalla nukleiinihappoja ja esiintymällä vaikeasti puhdistettavina epäpuhtauksina näytteessä. Näytteen epätäydellinen puhdistus vaikeuttaa kvantitatiivista määrittäystä varsinkin runsaasti orgaanista ainesta sisältävistä näytteistä ja nostaa samalla määritysrajaa. Genotyyppisten merkkigeenianalyysien määrittämenetelmien huolellisella optimoinnilla on kuitenkin onnistuttu laskemaan määritysraja hyvin alhaisiksi. Tämä osoittaa genotyyppisten merkkigeenien käyttökelpoisuuden riskianalyysissä.

4.2 Koettimien käyttö

Koettimet ovat lyhyitä DNA-sekvenssejä, jotka sitoutuvat hybridisaatiossa näytessä oleviin homologiin nukleiinihapposekvensseihin. Koetin leimataan signaalimolekyyllä, joka on helppo osoittaa. Näin tutkittava sekvenssi voidaan tunnistaa suuren tausta-DNA:n joukosta. Yleisin käytetty signaalimolekyyli on ollut radioaktiivinen fosfori (^{32}P), mutta uusien menetelmien myötä väri- ja valosignaalien käyttö on yleistymässä. Vaikka ei-radioaktiiviset leimat ovat vähemmän herkkiä kuin radioaktiiviset, myös ei-radioaktiivisten leimojen avulla päästään alhaisiin määritysrajoihin. Maasta eristetyille DNA:lle määritysraja oli 10 pg määrittäessä koetin joko kolorimetrisesti tai kemiluminesenssin avulla (Saano & Lindström, 1992).

Steffan et al., (1989) seurasivat *P. cepacia*- ja *Alcaligenes*- kantojen pysyvyyttä makeassa vedessä käyttäen koettimina kahta eri kokoista ^{32}P -leimattua DNA -sekvenssiä, joiden kohdesekvenssi esiintyi solussa eri kopiomääränä. Koettimen teho parani, kun koetin oli lyhyt ja homologisten sekvenssien lukumäärä kohdeorganismissa oli suuri. *P. fluorescens*- bakteeria seurattiin maassa kromosomiin lisätyn 668 emäsparin kokoisella *pat*-merkkigeenillä. Tämä geenin osa on eristetty perunasta eikä se normaalisti esiinny maaperän mikrobipopulaatiossa. Pelkkää ^{32}P -hybridisaatiota käyttäessä määritysraja oli korkea (10^6 pmy grammassa kuivaa maata), mutta vahvistettaessa seurattavan geenin signaalia PCR:llä, saatiin määritysrajaksi 10^4 solua grammassa kuivaa maata (van Elsas et al., 1991). Kohde-DNA:n monistus oli tarpeen myös makeasta ja jätevedestä tehdyssä tutkimuksessa, jotta ruohosta eristettyä 300 emäsparin sekvenssiä voitiin käyttää *E. coli*-kannan merkkigeeninä. PCR:n avulla merkkigeeniä pystyttiin seuraamaan 14 päivän kuluttua lisäyksestä, vaikka pesäkkeitä muodostavia soluja ei enää näytteestä havaittukaan. Määritysraja oli alle 10^5 pmy millilitrassa (Chaudhry et al., 1989).

Pelkkä koettimien käyttö tunnistusmenetelmänä ei siis saavuttane samaa herkkyyttä kuin monet fenotyyppiset määrittäykset. Monistamalla ensin PCR:llä tutkittavaa geenisekvenssiä päästään kuitenkin usein huomattavaan herkkyyteen.

4.3 Polymerase chain reaction (PCR) -menetelmä

PCR- menetelmässä ennestään tunnettu geenisekvenssi toimii mallina eksponentiaalisessa monistuksessa, jolloin hyvinkin pienet määrät merkkigeeniä voidaan havaita geelielektroforeesin ja/tai koettimen avulla. Hygieenisessä vesianalyysissä PCR:n ja radioaktiivisen koettimen avulla tutkittiin koliformien kokonaismäärää *lacZ*-geeniä monistamalla ja suolistoperäisten koliformien osuutta *gusA*-geeniä monistamalla. Menetelmän avulla pystyttiin määrittämään viisi solua tai 10 fg DNA:ta 100 millilitrassa jokivettä. Vaikka menetelmän määritysraja ei ollut pienempi kuin maljoilla viljeltävien solujen määritysraja, oli menetelmä nopeampi ja parempi, koska sillä onnistuttiin määrittämään myös ei-kasvatettavia soluja (Bej

et al., 1990; 1991a). Kun näytteitä rikastettiin suodattamalla, pieneni määritysraja yhteen soluun tai yhteen fg:aan DNA:ta 100 millilitraa kohti (Bej et al., 1991b). Yksi bakteerisolu sisältää noin yhdeksän fg DNA:ta (Sambrook et al., 1989).

P. cepacia -kantaa seurattiin maassa käyttäen solussa noin 20 kertaa esiintyvää geenisekvenssiä PCR-reaktion kohdesekvenssinä. Uuttamalla DNA suoraan maasta pystyttiin löytämään yksi solu grammassa sedimenttiä, jossa oli 10^{11} luonnon bakteeria (Steffan & Atlas, 1988). Käyttäen toista useasti genomissa esiintyvää 16S ribosomaalista RNA:ta koodaavaa geeniä kohdesekvenssinä, *E. coli*-bakteerin määritysraja PCR:ssä oli alle 10^3 solua grammassa sedimenttiä ja alle 5×10^2 solua grammassa maata (Tsai & Olson, 1992). Kun solut eristettiin maasta ennen DNA:n uuttoja seurattaessa *Rhizobium*-kantaa kerran genomissa esiintyvän *Tn5* merkkigeenin avulla, oli määritysraja yhdestä kymmeneen pmy grammassa maata (Pillai et al., 1991). Toisaalta, seurattaessa *P. fluorescens*-kantaa hyönteisen ulosteessa oli määritysraja noin 10^3 solua grammassa ulostetta. Tässä tutkimuksessa maljalla viljeleminen oli herkempi määritysmenetelmä kuin PCR:n käyttö (Clegg et al., 1994).

E. coli-solujen määritysraja oli 20 fg DNA:ta ja viisi solua grammassa maata, kun seurattava geeni oli monikopioplasmidissa. Merkkigeeniä ei löydetty maasta neljän viikon kuluttua bakteeriliskäyksestä (Henschke et al., 1991). Toisaalta PCR:n avulla osoitettiin, että *Alcaligenes*-bakteerin merkkigeeni pysyi maassa, vaikka kanta ei enää pystynyt kasvamaan maljalla (Dijkmans et al., 1993). *P. fluorescens*-kannan merkkigeeni oli seurattavissa maassa viisi kuukautta lisäyksen jälkeen, vaikka pesäkkeitä muodostavia soluja ei ollut osoitettavissa (Smalla et al., 1993). Myös *E. coli*-bakteerin DNA:ta havaittiin PCR:n avulla, vaikkei näytteestä edes immunofluoresenssilla pystytty havaitsemaan kokonaisia soluja. Siksi arveltiin, että tunnistettu DNA oli vapaassa muodossa, joka säilyi maassa ainakin 40 päivää (Recobert et al., 1993).

PCR:n avulla voidaan GMM:a seurata vielä sen jälkeen, kun organismi on muuttunut maljoilla ei-kasvatettaviksi eikä organismia voida fenotyyppisesti määrittää. Muunnetut geenit voivat olla läsnä näytteessä toimintakyvyttömiä tai kuolleiden solujen muodossa, vapaana DNA:na tai luonnon organismeihin siirtyneinä. PCR:n tehokkuuden takia väärin positiivisten tulosten riski on suuri. Siksi tulisi aina kontrollinäytteiden avulla varmistua siitä, että tulos on luotettava.

4.3.1 Kvantitatiivinen PCR

Pitkään arveltiin, että PCR ei sovellu kvantitatiiviseksi määritysmenetelmäksi. Tämä johtuu siitä, että nukleinihapot monistuvat eksponentiaalisesti PCR:ssä, joten hyvin pienet erot reaktion muuttujissa eri näytteiden välillä vaikuttavat ratkaisevasti lopputuotteen määrään. PCR:än perustuvalla kvantitatiivisella MPN-menetelmällä on määritetty 10^4 - 10^8 *A. tumefaciens*-bakteerin solua grammassa maata (Picard et al., 1992). MPN-menetelmässä tarvitaan määrittämiin suuri määrä rinnakkaisnäytteitä. Koska rinnakkaisnäytteiden monistus ei välttämättä tapahdu tarkasti samalla tehokkuudella, PCR:ään perustuvaa MPN-menetelmää ei pidetä luotettavana.

Edellä kuvatut ongelmat voidaan välttää käyttämällä PCR tekniikkaa, jossa näytteeseen lisätään tunnettu määrä sisäistä standardia. Standardin monistuminen rinnakkain tutkittavan sekvenssin kanssa riippuu samoista reagensseista, fysikaalisista oloista ja epäpuhtauksista kuin tutkittavan merkkigeenin. Standardisekvenssi monistuu siksi yhtä tehokkaasti kuin tutkittava geeni. Standardisekvenssin eri laimennoksia lisätään näytteeseen ja kohdegeenin PCR tuotteen määrää verrataan sisäiseen standardin määrään reaktion jälkeen. Jotta geenit erotet-

taisiin elektroforeesissa, on kilpailevan geenin oltava eri kokoinen kuin kohdegeeni tai siinä on oltava restriktiokohta, joka puuttuu kohdegeenistä (Steffan & Atlas, 1991). Menetelmä ei vielä ole yleisessä käytössä, mutta kilpailevaa sisäistä standardia on käytetty *Pseudomonas spp.*-solujen määrittämiseen kvantitatiivisesti merivedestä, johon oli lisätty 10^1 - 10^4 solua millilitraan (Leser, 1995). On todennäköistä että menetelmä yleistyy tulevaisuudessa.

Mikrobitoiminnan seuranta merkkigeenien avulla

Elävien GMM:ien toimintaa voidaan seurata merkkigeeneillä, jotka antavat organismille uuden, näkyvän ominaisuuden, joka ei esiinny luonnollisesti ympäristön mikro-organismeissa. Liitettäessä fenotyyppistä merkkigeeniä uuteen isäntä-organismiin on varmistuttava siitä, että solu pystyy tuottamaan merkkigeenistä toimivan proteiinin, joka voidaan mitata. Nämä merkkigeenit aiheuttavat solulle energettisen taakan useammin kuin lyhyet genotyyppiset merkkigeenit. Ne kuvaavat GMM:n osapopulaatiota, joka on aktiivisessa toiminnassa ja siksi vaikuttaa tehokkaammin ympäristössä. Useimmat valikoivat merkkigeenit voidaan määrittää vain laboratoriokasvatuksen jälkeen, mutta ei-valikoivia merkkigeenejä voidaan määrittää myös ilman kasvattamista. Määritykset ovat usein yksinkertaisia suorittaa, vaikka pienien solumäärien määrittäminen usein vaatii herkän laitteiston.

5.1 Antibioottiresistenssiä koodaavat merkkigeenit

Geeniteknisesti muunnettuja mikro-organismeja on seurattu ja tunnistettu antibioottiresistenttisuutta koodaavien merkkigeenien avulla jo pitkään. Merkkigeenit on helppo valmistaa joko spontaanimutaatioiden avulla tai luonnossa esiintyvien, plasmidissa tai transposoneissa sijaitsevien merkkigeenien avulla. Menetelmän suuri valikoiva vaikutus kasvatettaessa organismeja maljoilla on tehnyt menetelmästä suosituksen. Se on usein standardikäytäntöä kloonauksessa laboratorioissa. Valikoivat merkkigeenit ovat tarpeellisia kloonauksessa, jotta GMM löydetäisiin suuren villityyppisen luonnon populaation joukosta.

Antibioottiresistenssiä koodaavien merkkigeenien käyttö luonnossa on kuitenkin ongelmallista, sillä antibioottiresistenssigeenejä esiintyy yleisesti luonnon mikro-organismeissa. Vaikka antibioottiresistenttien kantojen määrä vaihtelee paikasta riippuen (Margee & Quinn, 1991), on lähes jokaisessa tutkitussa ympäristössä havaittu suuri määrä luonnostaan antibioottiresistenttejä mikrobeja, jotka haittaavat määrittämiä (Taulukko 1). On myös osoitettu, että pidemmän ajan kuluttua kaikkia näytteessä olevia GMM:ja ei voida määrittää maasta suoraan antibioottimaljoilla kasvattamalla, mikäli kantoja ei ensin elvytetä oloissa, jossa ei ole antibiootteja. *Rhizobium*-kanta, jonka plasmidissa oli kanamysiiniresistenssigeeni, ei enää 12 päivän kuluttua ilmentänyt geeniä maassa, vaikka geeni oli solussa läsnä hybridisaatioanalyysin perusteella (Pillai & Pepper, 1991). Tämä voi johtua laboratorion heikkenemisestä luonnossa niin, ettei se ilmentänyt resistenssigeenejään ilman toipumista vähemmän rasittavalla alustalla (Devanas et al., 1986). Käyttämällä antibioottiresistenssigeenejä ympäristöissä, jossa luonnon tausta on alhainen, ihminen saastuttaa ympäristön kyseisellä merkkigeenillä ja voi siten edesauttaa merkkigeenin siirtymistä GMM:sta ihmiselle, hyötykasveille tai eläimille haitalliseen organismiin. Riski riippuu yksittäisten resistenssigeenien siirtymiskyvystä, mutta antibioottiresistenssigeenien kokonaismäärä luonnossa vaikuttaa todennäköisyyteen. Kanamysiiniresistenssigeeniä on kuvattu turvallisiksi muunnettujen kasvien merkkigeeniksi muassa geenien alhaisen siirtymisriskin takia kasveissa sekä valintaedun puuttumisen takia luonnossa (Nap et al., 1992). Geeniteknisesti muunnettujen organismien riskin minimoimiseksi

Taulukko 1. Esimerkkejä kirjallisuudessa esitetyistä luonnollisten antibioottiresistenttien bakteerien määristä.

Antibiootti	Maa- perä ^a pmy/g ^f	Kasvien lehdet ^b pmy/g ^f	Makea vesi ^c ‰ ^e	Meri- vesi ^d ‰ ^e	Suoliisto ^e pmy/g ^f
Streptomysiini	1,6x10 ⁴	6,3x10 ²	9	39	nd
Spektinomysiini	2,8x10 ²	nd	nd	nd	nd
Kanamysiini	2,3x10 ⁵	<	50	33	1,3x10 ³
Ampisilliini	1,4x10 ⁵	1,9x10 ³	18	nd	1,0x10 ⁴
Sulfonamidi	1,4x10 ⁵	nd	nd	38	1,4x10 ⁴
Kloramfenikoli	2,3x10 ⁴	nd	11	13	3,9x10 ³
Tetrasykliini	1,0x10 ⁴	5,5x10 ²	6	76	1,3x10 ⁵
Gentamysiini	7,7x10 ⁴	nd	nd	14	nd
Kanamysiini + Tetrasykliini	1,1x10 ⁴	<	nd	nd	nd

^a Schmidt et al., 1991^b K. Björklöf, julkaisematonta tietoa^c Magee et al., 1991^d Avilés et al., 1993^e Henschke et al., 1989; Huysman et al. 1993^f määrät ilmoitettu kokonaismääränä pesäkkeitä muodostavia soluja per g^e määrät ilmoitettu prosentteina kaikista tutkituista kannoista nd, ei määritetty<, alle määrittämissärajaa (10²).

olisi tärkeää, ettei antibioottiresistenssigeenejä päästetä luontoon (Ford & Olson, 1988; de Lorenzo & Timmis, 1992; Cebolla et al., 1993; Möller, et al., 1994), vaan suositaan muita tehokkaita valikoivia merkkigeenejä, joiden käyttö usein on yhtä helppoa kuin antibioottiresistenssiin perustuva merkkigeenien käyttö.

Luonnollisista taustapopulaatioista huolimatta on antibioottiresistenssigeenejä käytetty yksin tai muihin merkkigeeneihin yhdistettyinä GMM:ien seurannassa ympäristössä. Antibioottiresistenssigeenejä on käytetty sekä maa-, juuri- ja sedimenttitutkimuksiin että makean ja suolaisen veden tutkimuksiin. Konjugatiota, transformaatiota ja transduktiota on myös tutkittu merkkigeenien näiden avulla.

5.1.1 Siirtokelvolliset antibioottiresistenssiä koodaavat merkkigeenit

Siirtokelvolliset antibioottiresistenssimerkkigeenit ovat soluun lisättyjä geenejä, jotka tuottavat solulle aivan uusia entsyymejä. Nämä voivat estää tietynlaisten antibioottien, kuten kanamysiinin, ampisilliinin, streptomysiinin, tetrasykliinin tai gentamysiinin siirtymistä solukalvon läpi tai poistaa antibiootin myrkyllisyyden. Nämä antibioottimerkkigeenit lisätään soluun plasmidissa tai transposonimutageneesin avulla (Trevors et al., 1990) ja niiden nukleotidisekvenssi tunnetaan. Tämä mahdollistaa myös genotyyppisen seurannan koettimien ja PCR:n avulla.

Maassa on tavattu noin 10⁴ streptomysiini-, kloramfenikooli- tai tetrasykliiniresistenttiä ja 10⁵ kanamysiini-, ampisilliini- ja gentamysiiniresistenttiä pmy gram-massa kuivaa maata. Tutkituista *Salmonella*-kannoista 95 prosenttia oli tetrasykliiniresistenttejä (Moriño et al., 1990). Taajamien pohjavesistä eristetyistä *E. coli*-kannoista 87 prosentilla esiintyi antibioottiresistentsyyttä (McKeon et al., 1995). Meriveden Gram-negatiiviset bakteerit olivat useimmiten resistenttejä amoksisilliinille, kefalotriinille ja tetrasykliinille ja Gram-positiiviset streptomysiinille, kanamysiinille ja sulfamidille (Avilés et al., 1993). Luonnolliset antibioottiresistenssigeenit ovat usein kytkettyjä niin, että samassa plasmidissa on geenit usealle an-

tibioottiresistenttisuudelle. Jopa 10^4 pmy grammassa kuivaa maata olivat moniresistenttejä kanamysiinille, ampisilliinille ja tetrasykliinille (Schmidt et al., 1991). Kotitalouksien jätevesistä ja merikaloista on eristetty suuri määrä moniresistenttejä *E. coli*-kantoja (Hassani et al., 1992; Silva & Hofer, 1993; Mezrioui & Baleux, 1994). Jopa pullotetusta mineraalivedestä on löytynyt usealle antibiootille resistenttejä bakteereja (Massa et al., 1995). Arvellaan, että lähivuosina kasvanut antibioottiresistenttien organismien määrä johtuu antibioottien lisääntyneestä käytöstä, joka aiheuttaa valintapaineen helposti siirrettäville antibioottiresistenssiä koodaaville geeneille ympäristössä (Margee et al., 1991).

5.1.2 Siirtokelvottomat antibioottiresistenssisyötä koodaavat merkkigeenit

Siirtokelvottomat antibioottiresistenssimerkkigeenit ovat fenotyyppisiä ominaisuuksia, jotka voivat ilmentyä bakteerikannassa spontaanimutaatioiden avulla ilman geeniteknistä muokkausta. Tästä syystä ne ovat pysyvämpiä soluissa kuin kokonaisten geenien avulla lisätyt antibioottiresistenssiominaisuudet. Näitä kantoja ei voida seurata genotyyppisesti koettimien avulla, koska tarkkaa sekvenssiä mutaatioista ei ole (van Elsas et al., 1991). Useimmin käytettyjä siirtokelvottomia antibioottiresistenssimerkkigeenejä ovat rifampisiiniresistenssiä ja nalidiksiinihapporesistenssiä aiheuttavat mutaatiot (Drahos, 1991). Rifampisiiniresistenssi aiheutuu mutaatiosta RNA polymeraasin β -yksikössä ja nalidiksiinihapporesistenssi johtuu DNA-gyraasin rakenteellisesta muutoksesta. Mutaatiot saavat aikaan sen, että solun muuttuneet entsyymit eivät enää reagoi antibiootin kanssa, eikä antibiootti pysty vaikuttamaan niiden toimintaan. Ongelma on se, että monet näin merkityt organismit muuttuvat myös muilta ominaisuuksiltaan, kuten patogeenisuudeltaan, kolonisaatiokyvyltään ja membraaniominaisuuksiltaan (Compeau et al., 1988). On myös osoitettu, että maassa pidetty rifampisiiniresistentti *P. fluorescens*-kanta ei enää kasvanut rifampisiinilla (Compeau et al., 1988). Myös *Rhizobium*-bakteerin luonnollinen antibioottiresistenttisyys muuttui maassa viidessä vuodessa (Lindström et al., 1990).

Luonnollisten nalidiksiinihapporesistenttien ja rifampisiiniresistenttien bakteerien määrä vaihtelee eri ympäristöissä. Nalidiksiinihapporesistenttejä kantoja ei esiintynyt makean veden *Salmonella*-kannoissa (Morinño et al., 1990), mutta jopa 39 prosenttia mineraaliveden eri lajien kannoista oli nalidiksiinihapporesistenttejä (Massa et al., 1995). Rifampisiiniresistenttien bakteerien määrä maassa voi olla jopa 10^5 solua grammassa (Drahos et al., 1986), mutta kasvien pinnoilla rifampisiiniresistenttien populaatioiden koko on yleensä pieni (Weller & Saettler, 1978).

Koska tämäntyyppisen antibioottiresistenssimerkkigeenien ilmentyminen aikaansaadaan kromosomissa tapahtuvan luonnollisen mutaation johdosta, ominaisuuden todennäköisyys siirtyä muihin organismeihin on pieni. Antibioottiresistenttigeenien kokonaismäärän pitämiseksi mahdollisemman alhaisella tasolla olisi kuitenkin parempi käyttää muita valikoivia merkkigeenejä avoimessa käytössä.

5.2 Myrkyllisten aineiden sietokykyä nostavat merkkigeenit

Lisäämällä isäntäorganismiin merkkigeeni, joka nostaa kannan sietokykyä tietyille myrkyllisille aineille, kuten kasvinsuojeluaineille tai raskasmetalleille, voidaan GMM:a määrittää valikoivasti fenotyyppinsä perusteella. Tämän tyyppisten va-

likoivien merkkigeenien käyttö on turvallisempaa ympäristöseurannassa kuin antibioottiresistenttisyttä koodavien geenien käyttö (Herrero et al., 1990). Onkin kehitetty kuljetusvektoreita, joissa *Streptomyces*-suvun tuottama *bar*-geeni koodaa resistenttisyttä fosfinotrisiinini-nimiselle kasvinsuojeluaineelle (Thompson et al., 1987). *Pseudomonas*- ja *Salmonella*-suvuista on eristetty glyfosaatti-herbisidille *igr*- ja *aro*-resistenssigeenit (Fitzgibbon & Braymer, 1990; Comai et al., 1983). Enterobakteereista peräisin olevat *ars*-geenit koodaavat arсениittiresistenssiä (Chen et al., 1985). *Serratia*-suvusta on eristetty *mer*-geeni, joka parantaa solun elohopeasuolojen ja orgaanisen elohopean sietokykyä (Griffin et al., 1987). Luonnossa geenin siirtoa vastaanottajabakteereihin tai luonnonpopulaatioon on tutkittu lampi- ja jokivedessä plasmidissa sijaitsevan *mer*-geenin avulla (Bale et al., 1987; Barkay et al., 1993). *P. putida*-kantaan voitiin seurata fosfinotrisiini-resistenssin avulla maassa (Ramos et al., 1991).

Myrkyllisten aineiden sietoa parantavat geenit on eristetty luonnonkannoista, joten tietyissä ympäristöissä voi luonnon bakteereissa esiintyä merkkigeeniä muistuttavia luonnongeenejä (Silva & Hofer, 1993; Avilés et al., 1993; Schmidt et al., 1991). On havaittu, että mikro-organismien luonnollinen mukautuminen ympäristösaasteisiin riippuu plasmidien koodaamista ominaisuuksista (Mergey et al., 1990). Usein sama bakteeri voi olla resistentti sekä antibiooteille ja raskasmetalleille (Avilés et al., 1993). Jos geenit, jotka koodaavat näitä ominaisuuksia, sijaitsevat samassa plasmidissa, voi esimerkiksi raskasmetalleilla tai kasvinsuojeluaineilla saastuneen ympäristön valintapaine aiheuttaa luonnonbakteereissa myös antibioottiresistenssigeenien yleistymistä.

5.3 Muita valikoivia merkkigeenejä

Geeniteknisesti muunnetulle mikro-organismille voidaan saada valintaetu laboratoriokasvatuksissa myös lisäämällä soluun geeni, joka mahdollistaa epätavallisen aineen käytön ravinteina tai kasvun ilman lisättyjä hivenaineita. Esimerkiksi *Lactococcus lactis*-bakteerista eristettyä *thyA*-geeniä on ehdotettu merkkigeeniksi ympäristöseurantaa varten (Ross et al., 1990). Tämä geeni muuttaa kantoja niin, että ne pystyvät kasvamaan alustalla, jossa tymidiiniä on vähän. Menetelmä toimii kloonauksessa, mutta koska ympäristössä esiintyvien taustabakteerien tymidiinivaatimukset voivat vaihdella paljon, on sen käyttäminen luonnon näytteissä kyseenalaista.

Lupaava merkkigeeni on *Agrobacterium tumefaciens*-bakteerin Ti-plasmidista eristetty *moc*-geeni. Tämä geeni antaa kannalle kyvyn käyttää mannopiiniä ja agropiiniä ainoana hiilen-, typen- ja energian lähteenä. Luonnossa nämä yhdisteet ovat erittäin harvinaisia ja vain eräät *Agrobacterium*-kannat tuottavat niitä muodostaessaan kasvaimia kasveissa. Tästä syystä luonnon mikrobit *Agrobacterium*-lajia lukuunottamatta harvoin pystyvät käyttämään näitä hiiliyhdisteitä. Selektiomaljoilla pystyttiin merkitty *P. fluorescens*-kanta määrittämään jopa 10^8 :n muun bakteerisolun läsnäollessa ja merkkigeeniä pystyttiin seuraamaan genotyyppisesti PCR:n avulla (Hwang & Farrand, 1994). Toinen samaan valintaperiaatteen perustuva merkkigeeni, joka myös on nimetty *moc*-geeniksi, on eristetty *Rhizobium*-bakteerista (Rossbach et al., 1995). Tämän geenin valikoiva vaikutus perustuu ritsopiini-ravintoaineen käyttöön ainoana hiilenlähteenä. On todennäköistä, että tämän tyyppisten merkkigeenien käyttö yleistyy sitä mukaa, kun uusia, harvinaisia ominaisuuksia omaavia mikro-organismeja eristetään.

5.4 Kolorimetriset merkkigeenit

Kolorimetriset merkkigeenit ovat fenotyyppisiä merkkigeenejä, jotka koodaavat isäntäorganismissaan uusia entsyymejä, joiden katalysoiman reaktion lopputuote on värillinen. Geenituote havainnoidaan maljoilla kasvatettavien pesäkkeiden tai kasvuliuoksen värin muutoksena substraattilisäyksen jälkeen. Vaikka näillä merkkigeeneillä ei ole valikoivia ominaisuuksia, perustuu niiden määrittäminen usein laboratoriokasvatukseen. Entsyymien kokonaismäärä voidaan mitata ELISA-menetelmällä tai proteiini-vasta-ainehybridisaatiolla ja entsyymitoimintaa voidaan mitata spektrofotometrisesti. Paljon käytettyjen *lac*-, *xylE*- ja *gusA*- geenien DNA-sekvenssit tunnetaan, joten hybridisaatio- ja PCR- menetelmiä voidaan käyttää ko. geenien genotyyppiseen seurantaan (Leung et al., 1995; Nakai et al., 1983; Wilson et al., 1992).

5.4.1 *lacZY*

Escherichia coli:n *lacZY*-geenit koodavat β -galaktosidaasi- ja laktoosipermeaasi-entsyymejä. *lacZ*- geenin sisältävät bakteerit pystyvät hajottamaan X-Gal (5-kloro-4-bromo-3-indolyyli β -D-galaktopyranosidia)-substraattia, jonka hajoamistuote on sininen. Kun soluun lisättiin *lacZY* geeni, kanta pystyi käyttämään laktoosia ainoana hiilenlähteenään yhtä tehokkaasti kuin glukoosia. Solut muuttuivat sinisiksi, kun bakteereita kasvatettiin alustalla, joka sisälsi X-gal:ia (Drahoš et al., 1986).

Fluoresoivilta *Pseudomonas*- kannoilta puuttuu kyky tuottaa β -galaktosidaasia ja siten myös kyky kasvaa laktoosilla. Tästä syystä *lacZY*:ä on käytetty merkkigeeninä tunnistettaessa lisättyjä fluoresoivia *Pseudomonas*- bakteereita maanäytteistä (Drahoš et al., 1986). Useimmissa sovellutuksissa on käytetty määrittämenetelmiä, jotka vaativat solujen kasvattamista laboratoriossa. *P. aureofaciens*- bakteerin siirtymistä maassa tutkittiin *lacZY*- merkkigeenien avulla. Määrittäysraja oli 100 pmy grammassa maata (Gillespie et al., 1995). *P. fluorescens*-bakteeria pystyttiin seuraamaan kuukauden ajan sokerijuurikkaan juuristossa *lacZY*- merkkigeenin avulla (Fedi et al., 1996). Yhdistelemällä kanamysiiniresistenttisyttä ja *lacZY*-merkkigeenejä pystyttiin *P. aeruginosa*- kantaa seuraamaan maassa kolmen kuukauden ajan. Jopa kuivassa maassa eläviä soluja oli noin 100 pmy grammassa maata (Höfte et al., 1990). Määrittäysraja oli 10 pmy grammassa maata. Jokivedessä näiden lajien selviytyminen vaihteli niin, että *P. aeruginosa*- kannan pesäkkeitä muodostava solumäärä pieneni alle määrittäysrajan, joka oli 10 pmy millilitrassa vettä. *P. aureofaciens*- kannan populaatio sen sijaan kasvoi ja oli 30 päivän jälkeen noin 30 prosenttia bakteerien kokonaismäärästä (Leung et al., 1995). Myös *lacZ*-merkityn *Azospirillum*- typensitojabakteerin asettumista juuristoon voitiin seurata tarkastelemalla sinisiä bakteerisoluja juurten pinnalla X-gal-käsittelyn jälkeen (Katupitiya et al., 1995). Toisessa tutkimuksessa *P. aeruginosa*- kannan seuranta *lacZY*-merkkigeenin avulla puolestaan epäonnistui, koska jopa 42 prosenttia luonnonpopulaatiosta maassa pilkkoi X-gal:ia (Flemming et al., 1994a). Onkin osoitettu, että luonnollisia *lac*-geeniä sisältäviä, laktoosia hiilenlähteenä käyttäviä bakteereita löytyy ainakin aktiivilietteestä, maasta ja kasveista (Okamura et al., 1983; Drahoš et al., 1986; Wilson, 1995).

Rifampisiini- ja nalidiksiinihapporesistentin ja *lacZY*-geenillä leimatun *P. aeruginosa*- kannan asettumista ja leviämistä luonnossa tutkittiin tarkasti valvotussa kenttäkokeessa USA:ssa vuonna 1991 (Kluepfel et al., 1991). Kantaa seurattiin kasvattamalla maljalla, joka sisälsi valikoivina tekijöinä rifampisiinia ja nalidiksiinihappoa, laktoosia hiilenlähteenä sekä kolorimetriseen tunnistukseen X-gal:ia. Varotoimina aluetta ympäröi aita ja kasviton alue. Myös valumavedet kerättiin talteen, kaikki tarvikkeet desinfektoitiin, ja työntekijät vaihtoivat vaatteensa en-

nen alueelta poistumista. Todettiin, että maan pinnalle usautty kanta siirtyi sivusuunnassa enemmän korkeintaan 18 senttimetriä ja pystysuorasti juuriston mukana noin 30 senttimetriä lisäyskohdasta. Kromosomissa sijaitsevan merkkigeenin siirtymistä luonnonpopulaatioon ei todettu 10^4 tutkitussa luonnonkantaisessa bakteerissa hybridisaatiotutkimusten perusteella. Kanta käyttäytyi kaiken kaikkiaan hyvin samankaltaisesti kuin kasvatushuoneessa.

MPN- menetelmällä kyettiin määrittämään 10 solua grammassa maata *lacZY*-kanamysiiniresistenttisyys- ja *xylE*- merkkigeenejä yhdistelemällä (de Leij et al., 1993). Näitä ominaisuuksia hyödynnettiin *P. fluorescens* - kannan seuramisessa kenttäkokeessa Iso-Britanniassa 1993-1994 (de Leij et al., 1995; Thompson et al., 1995a). Tutkimuksessa sekä villikanta ja GMM aiheuttivat muutoksia kasvien juuristossa ja lehtien pinnoilla olevissa bakteerikannoissa, mutta muutokset olivat ohimeneviä. Kanta säilyi elossa paremmin kuin oli odotettavissa mikrokosmoskokeiden perusteella (Thompson et al., 1995b). GMM:n asettuminen luontoon vaihteli jopa 10000 kertaa eri vuosina. Siemeniin lisättyä GMM:a löydettiin maasta satunnaisesti 10 senttimetrin syvyydeltä ja pellon rikkakasveista. GMM:a ei löydetty ympäristön hyönteisistä, eikä leviämistä tapahtunut ilman kautta soke-rijuurikaspellolla. Vehnäpellolla sensijaan GMM:n todettiin siirtyvän noin kaksi metriä lisäyskohdasta, minkä arveltiin johtuvan maaperän suuresta vesipitoisuudesta. Seuraavan kasvukauden alussa GMM:a ei havaittu monivuotisten kasvien juurista eikä lehdistä, mutta sattumanvaraisesti ja ohimenevästi uusista kasveista.

Pelkän *lacZY*-geenin käyttö merkkigeeninä riippuu paljon kohdeympäristön luonnonmikrobeista. Geenin tuoma valintaetu kasvatettaessa soluja laktoosilla ei näytä olevan tarpeeksi valikoiva ympäristönäytteitä tutkittaessa. Menetelmän soveltuvuus ja tehokkuus lisääntyy, kun merkkigeeniä yhdistellään muihin tehokkaampiin valikoiviin merkkigeeneihin. *lacZY*-geenin salliminen käytettäväksi avoimessa ympäristössä osoittaa riskin tämän merkkigeenin suhteen olevan pieni. Seuraamalla näitä koekenttiä pidempään saadaan tärkeää lisätietoa mahdollisista odottamattomista haittavaikutuksista.

5.4.2 *xylE*

Pseudomonas putida- kannan TOL-plasmidista pWWO on eristetty *xylE*-geeni, jonka geenituote on katekoli 2,3-dioksigenaasi. Tämä entsyymi muuttaa värittömän katekolin keltaiseksi lopputuotteeksi. Värimuutos saadaan aikaan suihkuttamalla substraattia bakteerikasvuston positiivisten pesäkkeiden päälle. Entsyymi inaktivoituu hapen vaikutuksesta, joten spektrofotometrinen entsyymiaktiivisuusmittaus kertoo vain solunsisäisen entsyymimäärän. Vertaamalla entsyymien kokonaismäärää ELISA -määrityksessä entsyymiaktiivisuuteen voidaan verrata kokonaisten ja rikkoutuneiden solujen määrä näytteessä (Prosser, 1994). *xylE*- geeniä on käytetty merkkigeeninä useassa Gram-negatiivisessa bakteerissa (Winstanley et al., 1989). Entsyymien teho vaihtelee sekä käytetyn promootorin mukaan että isäntäorganismien mukaan. Toiminta on aktiivisempaa *Pseudomonas*- ja *Acinetobacter*-bakteereissa kuin enterobakteereissa (Morgan et al., 1989; Winstanley et al., 1991). Luonnonpopulaatioiden omat *xyl*-geenit voivat rajoittaa *xylE*- geenin käyttöä GMM:ien seurannassa eräissä maaperissä (Wipat et al., 1991).

Kun *P. putida*- kantaa seurattiin järvivedessä *xylE*- geenin avulla (Morgan et al., 1989), oli entsyymien kokonaismäärän määrittämisraja ELISA- menetelmällä mitattuna noin 10^3 pmy millilitraa vettä kohden ja spektrofotometrisesti mitattuna 5×10^3 pmy millilitraa kohden. Kasvattaminen maljoilla oli kuitenkin herkin määrittäytapa (määrittäysraja 10 pmy). Entsyymitoiminta ei ollut verrannollinen bakteerimäärään, sillä 10-kertainen bakteerilisyys kasvatti aktiivisuuden vain viisin-kertaiseksi.

Gram-positiivisessa *Bacillus sphaericus*-bakteerissa *xylE*-geeniä ilmentettiin vektori-plasmidin promoottorin alaisena (Taylor & Burke, 1991). Toisessa Gram-positiivisessa *Streptomyces lividans*-bakteerissa katekoli 2,3-dioksigenaasin toiminta ei ollut yhtä tehokasta kuin Gram-negatiivisissa kannoissa (Wipat et al., 1991) ja geenin säännöstelty ilmentyminen onnistui huonosti. Toisaalta todettiin, että *xylE*-geeni säilyi 80 päivää isäntäorganismin itiöissä maassa.

xylE:tä on käytetty useassa Gram-negatiivisessa ja Gram-positiivisessa bakteerikannassa, joten sen käyttö merkkigeeninä saattaa olla tehokampaa kuin *lacZY*-geenin, jota toistaiseksi on käytetty vain *Pseudomonas*-lajien tunnistukseen. Lisäksi *xylE*-geenin ilmentämistä on tutkittu myös entsymaattisesti, mikä mahdollistaa määrittelyn ilman laboratoriokasvatusta. On todennäköistä, että myös *lacZY*-geeni voidaan tunnistaa vastaavilla menetelmillä, vaikka siitä ei vielä ole raportoitu. *xylE*-geenin sisältävien GMM:ien käyttö on sallittu avoimessa ympäristössä yhdistettynä *lacZY*- ja antibioottiresistenttigeenien kanssa (de Leij et al., 1995; Thompson et al., 1995a).

5.4.3 *gusA*

E. coli-bakteerin *gusA*- (ennen *uidA*; Wilson et al., 1994) geenin proteiinituote β -glukuronidaasi hajottaa erilaisia β -D-glukuronideja. Kun substraatiksi valitaan esimerkiksi p-nitrofenyyli-glukuronidi tai 5-bromo-4-klooro-3-indolyli- β -D-glukuronidi, on reaktiotuote värillinen (Wilson, 1994). Jos substraatiksi sen sijaan valitaan 4-metyyli-umbelliferyyli-glukuronidi, on tuote fluoresoiva (Robinson, 1984). Glukuronihappoa esiintyy suolistossa, joten geeni on yleinen kliinisissä bakteerikannoissa. Yli 90 prosenttia *E. coli*-, yli 50 prosenttia *Shigella*- ja *Enterobacter*-, sekä kymmenen prosenttia *Streptococcus*-kannoista ilmentää tätä geeniä. Ympäristön *E. coli*-kannoista yli 90 prosenttia oli positiivisia. Ympäristön muissa mikrobiryhmissä kuten *Pseudomonas*-, *Agrobacterium*-, *Rhizobium*- ja *Bradyrhizobium*-lajeissa geeni näytti olevan harvinaisempi (Hansen & Yourassowsky, 1984; Pérez et al., 1986; Wilson et al., 1992).

Vaikka taustaa on raportoitu maasta ja kasveilta, on *gusA*-geeniä käytetty *Rhizobium*-bakteerien seurannassa kasvien juuristossa. *Rhizobium*-kannan nystyränmuodostusta on seurattu värireaktion avulla ilman laboratoriokasvatuksia (Wilson et al., 1994). Myös steriilistä vedestä *E. coli*-soluja on osoitettu määrittämällä *gusA*-geenin tuotetta (Adams et al., 1990). Kun näyte sisälsi muitakin kuin *gusA*-merkkigeeniä sisältäviä *E. coli*-bakteereita, merkityn kannan määrä yliarvioitiin noin 5-10-kertaisesti.

gusA-geenin käyttö merkkigeeninä on toistaiseksi ollut vähäistä ympäristössä usein esiintyvän taustan johdosta. Sen katsotaan olevan tehokas merkkigeeni varsinkin juuristossa, missä ei yleensä ole luonnollista *gus*-toimintaa. Maassa merkkigeeniä voisi käyttää yhdistettynä kanamysiiniresistenssigeeneihin, koska tämä yhdistelmä on harvinainen maaperän luonnon kannoissa (Wilson et al., 1994).

5.4.4 Muita kolorimetrisia merkkigeenejä

Kolorimetrisia merkkigeenejä ovat myös soluihin lisätyt geenit, jotka tuottavat solun väriin vaikuttavia proteiineja. *Chromobacterium violaceum*-bakteerista eristettyä *vio*-geeniä on esitetty mahdolliseksi merkkigeeniksi juuristobakteerien tutkimukseen (Wilson, 1994). Tämä geeni aiheutti useiden Gram-negatiivisten kantojen muuttumisen violetiksi (Pemberton et al., 1991). *C. violaceum*-bakteeri on ihmisen opportunistinen patogeeni, ja violakeiinillä on todettu olevan antibioot-

tisia vaikutuksia Gram- positiivisiin bakteerikantoihin (Karn et al., 1980; Sivendre & Tam, 1977). Siksi geenin käyttö ympäristösovellutuksissa tuskin on mahdollista. *Streptomyces antibioticus*-bakteerista on eristetty kaksi geeniä, jotka aiheuttavat melaniini-nimisen pigmentin tuottoa. *E. coli*-, *E. carotovora*-, ja *X. campestris*-kannat, joihin nämä geenit siirrettiin, muuttuivat melaniinia tuottaviksi ja niitä voitiin käyttää merkkigeeninä kloonauksessa (Tseng et al., 1990). Toistaiseksi geeniä ei ole käytetty ympäristössä.

Geeniä, jonka tuottaman entsyymin reaktiotuote ei ole värillinen, voidaan myös käyttää merkkigeeninä, mikäli reaktio voidaan muuten osoittaa. Luonnollisessa pRO103 -plasmidissa sijaitseva *tfd* -geeni koodaa 2,4- dikloorifenoksiase-taatti-monooksigenaasi-entsyymiä, joka muuttaa fenoksisetaatin fenoliksi. Fenolin muodostusta voidaan seurata spektrofotometrisesti tai nestekromatografi-sesti. Usean ainelisäyksen jälkeen fenoli voidaan myös muuttaa punaiseksi yh-disteeiksi, mikä helpottaa tutkittavan kannan erottamista taustabakteereista. Plas-midissa *tfd*-geenillä merkittyjä *P. aeruginosa*- ja *P. putida*- soluja pystyttiin osoitta-maan alimmillaan 10³ pmy millilitrassa (King et al., 1991). Ehkä määrityksen han-kaluudesta menetelmä ei ole yleisessä käytössä.

5.5 Jääkideaktiivinen merkkigeeni

Jääkideaktiivisuutta koodaava *inaZ*- geeni tuottaa membraaniproteiinia, joka ka-talysoi alijäähtyneen puhtaan veden jäätymistä suhteellisen korkeassa lämpöti-lassa. Geeni esiintyy kasvien pinnoilla *Pseudomonas*-, *Erwinia*- ja *Xanthomonas*- la-jeissa ja se on eristetty *P. syringae* -kannasta (Orser et al., 1985). Geeniä voidaan käyttää kantojen seurannassa luonnossa ilman laboratoriokasvatuksia, edellyttä-en, että tutkittavassa ympäristössä ei esiinny luontaista jääkideaktiivisuutta. Kos-ka alijäähtyneen veden jäätymislämpötila riippuu jääkideaktiivisten pintaprote-iinien määrästä näytteessä, voidaan näytteestä kvantitatiivisesti määrittää leimat-tujen mikrobien lukumäärä (Lindow, 1993). Merkkigeeninä *inaZ* -geeniä on tois-taiseksi käytetty vain *Pseudomonas*- kannoissa. Tällöin *inaZ*-geenin signaali oli jopa 10⁵ kertaa voimakkaampi kuin *lacZ*- geenin signaali (Lindgren et al., 1989). Yh-dysvalloissa paljon kohua herättänyt ensimmäinen kenttäkoe perustui GMM:iin, jonka genomista oli poistettu *ina*- geeni. Kantaa seurattiin antibioottiresistentti-syyden perusteella, eikä leviämistä koekentän ulkopuolelle voitu osoittaa (Lin-dow & Papulonous, 1988). Luonnollisia jääkideaktiivisia bakteereita on käytetty kaupallisena tuotteena avoimessa ympäristössä keinolumen valmistamisessa. Haittavaikutuksia ihmisen terveydelle tai ympäristölle ei tässä sovellutuksessa ole havaittu (Snomax Technologies; esite, 1995).

5.6 Valoa tuottavat merkkigeenit

Lusiferaasit ovat entsyymejä, jotka saavat soluissa aikaan valontuottoa eli biolu-minesenssia. Geeniteknisesti muunnetun mikrobin tuottama valo on helposti mää-ritettävissä oleva reaktiotuote, ja lusiferaasien käyttö merkkigeeneinä on siksi li-sääntynyt viime aikoina. Lusiferaasientsyymit jaetaan kahteen luokkaan: tumat-tomien organismien tuottamat *lux*- geenit ja tumallisten organismien tuottamat *luc*- geenit. Lusiferaasigeenillä merkittyjä mikro-organismeja voidaan seurata rea-aaliajassa jopa suoraan ympäristössä. Tämä mahdollistaa myös ei-maljoilla kas-vatettavien, mutta elävien solujen seurannan näytteessä. Luminometrian avulla ainoastaan aktiivinen osuus populaatiosta voidaan havaita, koska lusiferaasi- ent-syymit vaativat energiaa valon tuottoon. Valon tuotto soluissa kuvaa niiden to-dellista aktiivisuutta tietyssä hetkellisessä ympäristössä, mutta pidempi aika luon-

nossa vähentää usein mikro-organismien aktiivisuutta ja siten valon tuotto pienenee ajan mittaan. Koska ravinteet ovat usein rajoittavana tekijänä ympäristössä, valoa ei aina voida havaita ilman ravinteiden lisäämistä (Beauchamp et al., 1993). Koska lusiferaasi-entsyymeitä koodaavien geenien sekvenssit ovat tiedossa, myös itse geenien läsnäoloa voidaan seurata koettimien tai PCR:n avulla.

Bioluminesenssia voidaan mitata hyvin monella eri tavalla, joten lusiferaasimerkkigeenien käyttö sopii useimpiin sovellutuksiin. Jos tutkittava kanta tuottaa tarpeeksi valoa, se on mahdollista havaita esimerkiksi maassa tai juurten ja lehtien pinnalla paljaalla silmällä pimeässä. Myös valoa tuottavat pesäkkeet voidaan havaita paljaalla silmällä. Kannat, jotka antavat heikomman signaalin, voidaan havaita joko valokuvaamalla tai herkemmällä autoradiografialla pidempiä valotusaikoja käyttäen (Cebolla et al., 1991; 1993; 1995; Beauchamp et al., 1993; Bennerova & Crowley, 1994; Shaw & Kado, 1986; Fravel et al., 1990). Digitaalikamera ja videotekniikka tarjoavat hyvin herkän toteamistavan valoa tuottaville organismeille ja samalla ne mahdollistavat organismien jakauman tarkastelun ympäristössä. Mikroskooppiin yhdistettyinä menetelmät mahdollistaa yksittäisten solujen tunnistuksen (Shaw et al., 1992; Dane & Shaw, 1994; Silcock et al., 1992; Rattay et al., 1995).

Solujen tuottaman valon voimakkuutta voidaan kvantitatiivisesti määrittää joko tuikelaskijan tai luminometrin avulla. Bioluminesenssimäärittäjiin kehitetty luminometri on herkkyytensä vuoksi useammin käytetty. Menetelmässä voidaan mitata valontuottoa ma- tai vesinäytteessä joko suoraan tai substraattilisäyksen jälkeen. Maanäytteitä voidaan mitata myös nestesekoituksena. Jos mittaus suoritetaan heti noin 10 s ajan, selvitetään populaation hetkellinen toiminta, mutta jos näytettä säilytetään pidemmän aikaa ennen mittausta, niin populaation piilevää toimintakykyä voidaan mitata (Meikele et al., 1994). Menetelmän määrittäysraja riippuu solun tuottamasta valon voimakkuudesta ja luminometrin aiheuttamasta taustaloisteesta. Jos mittauksia suoritetaan maata sisältävistä näytteistä, on myös huomioitava, että esimerkiksi maapartikkelit voivat peittää valon aiheuttaen herkkyyden pienenemisen (Rattay et al., 1990). Määrittäysraja *E. coli*-bakteerille nousi viidestä kaksikymmenkertaiseksi ja *P. fluorescens*-bakteerille kolmesta viisinkertaiseksi maapartikkelien läsnäollessa (Amin-Hanjani et al., 1993).

5.6.1 lux

Bioluminesenssia aiheuttava *lux*-geeni on alunperin eristetty meribakteerikannoista *Vibrio fischeri* ja *V. harvey*. Menetelmä on käyttökelpoisen maassa ja makean veden ympäristöissä, joissa luonnollisesti eläviä bioluminoivia organismeja on vähän. Merkkigeeninä *lux* ei sovellu meriympäristöön, koska geeniä esiintyy yleisesti luonnonkannoissa. Myös maasta on löydetty bioluminoiva bakteeri: hyönteisille tautia aiheuttava *Xenorhabdus luminescens*, jonka lusiferaasientsyymillä on paljon homologiaa merestä eristettyjen bioluminoivien bakteerien kanssa (Schmidt et al., 1989). Myös sienistä on löydetty kantoja, jotka bioluminoivat (Campbell, 1989).

Bakteerin tuottama luminesenssi aiheutuu lusiferaasi-entsyymin toiminnasta, joka katalysoi seuraavan reaktion:



missä R on pitkäketjuinen aldehydi, joka toimii entsyymin substraattina. Entsyymin rakenteellisia osia koodaavat *luxA* ja *luxB*-geenit, jotka ovat kaksi kiloemäksen suuruisia. *luxI*- ja *luxR*-geenit säätelevät entsyymin tuottoa. *luxC*-, *luxD*- ja *luxE*-geenit tuottavat rasvahapporeduktaasia, jota solu tarvitsee tuottaessaan al-

dehydisubstraattia (Meighen, 1991). Jos solussa on vain entsyymien rakenteelliset geenit (*luxAB*), aiheutuu siitä entsyymien jatkuva tuotto, mutta substraattia on liittävä näyttöön ennenkuin bioluminenssia voidaan määrittää.

lux geenin käyttöä merkkigeeninä on tutkittu usean Gram-negatiivisen bakteerin kohdalla. Gram-positiivisissa bakteereissa on *lux*-geenin ilmentäminen huomattavasti vaikeampaa, mikä johtuu siitä, että valon tuotto näissä bakteereissa on noin 100 kertaa pienempää kuin Gram-negatiivisissa bakteereissa (Stewart & Williams, 1992). Lusiferaasientsyymiä on kuitenkin tuotettu Gram-positiivisissa *Lactobacillus*- (Ahmad & Stewart, 1991), *Streptomyces*- ja *Bacillus*-kannoissa (Cook et al., 1993; Sohaskey et al., 1992; Lampinen et al., 1992). Vaikka entsyymi vaatii toimiakseen hapetta, toimii *lux*-geeni myös ehdotonta anaerobiaa vaativassa Gram-positiivisessa *Clostridium perfringens*-bakteerissa. Tässä kannassa luminesenssi on yhtä voimakasta kuin *E. coli*-bakteerissa (Phillip-Jones, 1993). Myös yksittäisiä, valoa tuottavia *Anabaena spp.*-syanobakteerin soluja on löydetty (Schmetterer et al., 1986).

Erwinia cartotovorae-bakteerin infektioreittiä perunassa ja kukkakaalissa on tutkittu bioluminesenssin avulla. Patogeenin läsnäolo pystyttiin osoittamaan jopa 36 tuntia ennen näkyvien oireiden ilmaantumista (Shaw & Kado, 1986). *Enterobacter cloacae*-bakteereita juuristossa on tutkittu autoradiografian avulla (Fravel et al., 1990). Käyttäessään voimakasta *E. coli*-bakteerin rRNA-promootoria Bennerova & Crowley (1994) osoittivat, että kromosomaalisesti merkityn *P. fluorescens*-bakteerin määrittäminen juuristossa autoradiografialla 24 tunnin valotusajan jälkeen oli 3×10^5 pmy grammassa tuorepinoa juurta. *Xanthomonas campestris*-bakteerin asettumista kaalin lehdillä tutkittiin digitaalikameralla kromosomiin asennetun merkkigeenin avulla. Kanta pystytettiin seuraamaan lehden pinnalla kaksi kuukautta lisäyksen jälkeen. Digitaalikameran visualisoinnin määrittäminen oli $1,5 \times 10^4$ pmy lehteä kohti, kun valotusaika oli kymmenen minuuttia (Shaw et al., 1992; Dane & Shaw, 1994). Kantaan oli lisätty *luxCDABE*-geenit, joten ulkopuolista substraatin lisäystä ei tarvittu solujen valon tuottoon, eikä bakteerin luonnollista ympäristöä jouduttu muokkamaan määrittämisajan aikana. Yksittäisiä *P. syringae*- ja *E. cloacae*-soluja, jossa *lux*-geeni on plasmidissa, on osoitettu maassa ja rhizosfäärissä digitaalikameran avulla. Maapartikkelit kuitenkin osittain hättäsivät bakteerien tuottaman valon määrittästä (Silcock et al., 1992). Ravintopuutteen vuoksi valon tuoton arveltiin olevan alhainen maassa. Yksittäisiä *E. cloacae*-soluja pystyttiin osoittamaan vasta 30 minuutin valotusajan jälkeen (Rattay et al., 1995). Kromosomaalisesti merkittyjen Gram-positiivisten *Bacillus*-pesäkkeiden valon tuottoa ei voitu paljain silmin havaita, mutta pesäkkeitä pystyttiin havainnollistamaan digitaalikameralla viiden minuutin valotusajalla (Cook et al., 1993).

Kasvattamalla merkittyä kantaa maljoilla taustabakteerien läsnäollessa Grant (1991) osoitti, että valoa tuottavia pesäkkeitä on mahdollista havaita myös suuren taustabakteeripopulaation joukosta. Käytettäessä plasmidissa sijaitsevaa *lux*-merkkigeeniä *E. carotovora*-bakteerissa määrittäminen oli yksi pesäke 3000 valoa tuottamattomasta taustabakteerista kohti. Kvantitatiivinen määrittäminen oli epäluotettava, kun merkittyjen solujen määrä oli alle 50 prosenttia taustasta. Tällöin vain alle 60 prosenttia lisäyksiä soluista pystyttiin osoittamaan. Flemming et al., (1994a) havaitsivat, että bioluminenssiin perustuva pesäkkeiden määrittäminen maljoilla aliarvioi pesäkkeitä muodostavien solujen määrää jopa 20 prosenttia, jos maljalla oli yli 75 pesäkettä. Valon tuottoon perustuva MPN-menetelmä osottautui yhtä tehokkaaksi kuin kasvattaminen maljoilla. Molempien menetelmien määrittäminen oli kromosomaalisesti merkitylle *P. aeruginosa*-bakteerille viisi solua grammassa maata (Flemming et al., 1994b). *lux*-merkittyjä *P. fluorescens*-bakteeria on seurattu kastemadon suolistossa ja ulosteessa valoa tuottavien pesäkkeiden avulla (Tholpe et al., 1993). *Yersinia enterocolitica*-kanta sen sijaan pystytettiin seuraamaan paremmin maljaviljelemällä kuin luminometrisella määrittäyksellä (Kaniga et al., 1992).

Puhdasviljelmää tutkittaessa bioluminometrin avulla olivat plasmidimerkityjen *E. coli*-, *E. carotovora*- sekä *P. fluorescens*- bakteerien määritysrajat 200, 100 ja 1700 solua millilitrassa ja kromosomaalisesti merkityn *P. fluorescens* -bakteerin $8,9 \times 10^4$ solua millilitrassa (Rattay et al., 1990; Grant et al., 1992; Amin-Hanjani et al., 1993). Bioluminenssi oli suoraan verrannollinen solumäärään, niin kauan, kun bakteerit olivat aktiivisessa kasvuvaiheessa (Meikele et al., 1992). Tämä osoitettiin nesteviljelmissä muun muassa *E. coli*-, *E. cloacae*-, ja *E. carotovora*- kannoilla (Rattay et al., 1990; Rattay et al., 1995; Grant et al., 1992). *Pseudomonas fluorescens*- bakteerilla valon tuotto oli suoraan verrannollinen solumäärään ainoastaan, kun merkkigeeni liitettiin kromosomiin (Amin-Hanjani et al., 1993). Myös Fravel et al. (1990) osoittivat *E. cloacae*- bakteerin valontuoton olevan suoraan verrannollinen solumäärään, mutta he huomasivat myös, että riippuvuus vaihteli koe-erien välillä.

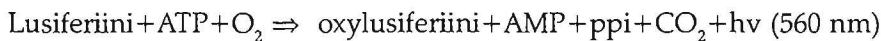
Ympäristönäytteissä pystyttiin kromosomiin asennetun merkkigeenin avulla seuraamaan *X. campestris*- bakteeria juuristossa vielä kuusi viikkoa lisäyksen jälkeen. Luminometrin määritysraja oli 5×10^2 pmy grammassa kuivaa maata. Kun näytettä rikastettiin pidentämällä valoitusaikaa 18 tuntiin, pystyttiin mittaamaan jopa 50 pmy grammassa kuivaa maata (Shaw et al., 1992). Valon määrän kvantifiointi osoitti solun vähentyneen aktiivisuuden ei-steriilissä ympäristössä, mikä johtui kilpailusta ravinnosta luonnollisten mikro-organismien kanssa. Toisaalta plasmidi-merkityn *E. carotovora*- bakteerin määritysraja oli 10^6 pmy grammassa kuivaa maata, mutta laimennettaessa maata 1/10 nesteeseen määritysraja putosi 10^4 pmy grammaan kuivaa maata (Grant et al. 1992). Bioluminointiin perustuva määrittäminen on kuitenkin laskettu olevan noin 1000 kertaa herkempi kuin β -galaktosidaasi määrittäminen juuristossa (de Weger et al., 1991), vaikka juuristossa ei tapahtunut optimaalista valontuottoa prosessin korkean energiavaatimuksen takia. *Pseudomonas* spp- kannan asettumista juurten pinnalla on tutkittu luminometrin avulla (Beauchamp, et al., 1993) ja *P. aeruginosa*- ja *P. fluorescens*- bakteerien kiinnittymistä juurten pintaan määriteltiin kvantitatiivisesti plasmidiin lisättyjen *lux*- geenien avulla bioluminometriä hyväksikäyttäen (Boelens et al., 1993).

Käytettäessä luminometriä solujen aktiviteettimäärittämisessä on sen todettu olevan herkempi ja toisettavampi kuin yleisesti käytetyt dehydrogenaasiaktiivisuus- ja respiometriset testit. Lisäksi luminometrialla pystytään tutkimaan merkityn kannan toimintaa myös sekaviljemässä. *P. fluorescens*- bakteerin aktiivisuus vähäravinteisessa maassa on osoitettu alenevan kolmasosaan alkuperäisestä 14 päivän kuluessa (Meikle et al., 1995). Organismien palautumiskyky lepotilan jälkeen osoitettiin *lux*- geenien avulla olevan riippuvainen epäsuotuisten olosuhteiden pituudesta. Solujen aktivointi pystyttiin osoittamaan muutamaa tuntia aikaisemmin kuin kasvua havaittiin (Meikle et al., 1994). *P. fluorescens*- bakteereilla luminometrinen aktiivisuusmäärittäminen oli herkempi ja nopeampi, mutta vähemmän luotettava tapa mitata aktiivisten solujen määrä populaatiossa kuin Koguren menetelmä (1979), jossa solujen pituuskasvua pidetään elon merkinä (Duncan et al., 1994). Valon tuotto pystyttiin osoittamaan yhdeksäntoista päivän jälkeen, vaikka solujen pituuskasvua ei ollut havaittavissa.

lux- geenin käyttöä merkkigeeninä on tutkittu paljon mitä erillisimmissä sovellutuksissa. Ympäristönäytteissä merkkigeenin käyttö näyttää olevan tehokasta, koska GMM:ia voidaan määrittää ilman laboratoriokasvatusta. Määrittäminen on usein helppo suorittaa, menetelmien rajoitukset ovat tarkasti tiedossa ja luonnonbakteerien aiheuttama tausta ei yleensä ole korkea. Eräillä bakteerikannoilla ollaan päästy hyvin alhaisiin määritysrajoihin. Eräissä sovellutuksissa voidaan määrittäminen suorittaa ilman mikroympäristön muuttamista, mikä helpottaa GMM:n todellisen ympäristöaktiivisuuden mittaamista. Toisaalta voidaan mitata myös kannan piilevää toimintakykyä.

5.6.2 *luc*

Aivan toinen ryhmä lusiferaasientsyymejä on eristetty *Photinus pyralis*- tulikärpäsestä ja sen lähisukulaisista. Entsyymi katalysoi seuraavaa reaktiota:



Substraattina toimiva lusiferiini on yhdiste, jota ei ole havaittu mikro-organismeissa (Cebolla et al., 1993). Substraattia on siksi aina lisättävä näytteeseen ennenkuin valon tuottoa voidaan mitata. Tumattomissa bakteerisoluisissa *luc*-geenien ilmentäminen ei toteudu geenin omalla tumallisten promoottorilla, vaan *luc*-geenin eteen on liitettävä tumattomien promoottorisekvenssi.

Verrattaessa *lux* ja *luc* -geenien aktiivisuutta *B. subtilis*- bakteerissa oli tulikärpäsestä lähtöisin oleva lusiferaasi noin kymmenen kertaa tehokkaampi solua kohti kuin *lux*- geenin (Lampinen et al., 1992). Tämä voi johtua siitä, että tulikärpäsen tuottama lusiferaasi tarvitsee vähemmän energiaa kuin bakteerista peräisin oleva entsyymi. On arvoitu, että *lux*-geenin koodaama entsyymi tarvitsee 60 ATP molekyyliä emittoidakseen yhden fotonin, kun taas *luc*-geenin koodaama entsyymi tarvitsee vain yhden (Koncz et al., 1990).

Maljalla kasvatettavien solujen määrän laskeminen *luc*-geenillä merkityillä *Rhizobium*- soluilla onnistui noin 10^5 taustabakteerin läsnäollessa. Tämä osoittaa sata kertaa suurempaa herkkyyttä kuin käytettäessä *lux*-geeniä *E. carotovora*- bakteerissa. Havaittu määrä oli kuitenkin vain kaksi ja puoli prosenttia odotetusta (Grant et al., 1991; Cebolla et al., 1993), mikä mahdollisesti johtui maljoilla kasvavien taustabakteerien haitallisesta vaikutuksesta. Verrattuna *lux*-geenin signaaliin myös *luc*- merkityillä *Rhizobium meliloti*- bakteerilla valon tuotto oli suoraan verrannollinen solukonsentraatioon eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa nesteviljelmässä, mutta ei maksimipopulaation soluissa (Cebolla et al., 1993; Möller, 1994). Puhdasviljelmässä havaittiin, että plasmidiin *luc*-merkittyä *E. coli*- bakteeria pystyttiin havaitsemaan luminometrisesti jopa kolme solua millilitrassa, jos solut olivat eksponentiaalisen kasvuvaiheen lopussa. Määritysraja maksimipopulaatioissa oleville soluille oli 25 solua millilitrassa. Jos määrittäessä käytettiin kokosolujen sijasta solu-uutosta, niin määritysraja oli riippumaton solun kasvuvaiheesta ja oli kymmenen solua millilitrassa (Möller, 1994). Tämä määrittäminen oli yli kymmenen kertaa herkempi kuin *lux*-geenille on raportoitu.

Myös *luc* -geenin valontuoton mittausta haittaa näytteissä olevat epäpuhtaudet. Puhdistettuna tulikärpäsen lusiferaasi inhiboituu suolapitoisuuden ylitäessä 0,1 mM (DeLuca & McElroy, 1978), joten tämä saattaisi rajoittaa valon tuottoa suolavesiympäristöissä. *luc*-geenillä merkittyä *Rhizobium*- bakteeria seurattiin autoradiografialla apilassa ja rukiissa, mutta kvantitatiivisia määrittäksiä ei onnistuttu tekemään (Cresswell et al., 1994). Sedimenttinäytteissä vain noin seitsemän prosenttia odotetusta valon tuotosta oli mitattavissa luminometrisellä kokosolumäärittäyksellä. Solu-uutto- menetelmällä lusiferaasitoiminta oli vain prosentti odotetusta (Möller et al., 1994). Tämä johtunee bakteerien aktiivisuuden pienenemisestä, siirrettäessä bakteerit laboratorio-oloista luontoon tai maapartikkelien vaimennusvaikutuksesta. Käyttöön otettiin sisäinen lusiferaasistandardi jotta epäpuhtauksien vaikutus mitattuun valoon voitaisiin ottaa huomioon. Menetelmää kehiteltäessä saatiin kromosomiin merkitylle *Synechocystis*- syanobakteerille määrittämisrajaksi 4×10^3 grammassa sedimenttiä ja kymmenen prosenttia näytteeseen lisätyistä lusiferaasista pystyttiin osoittamaan (Möller et al., 1995).

Pyrophorus plagiophthalmus- koppakuoriaisen tuottama lusiferaasi muistuttaa *Photinus pyralis*:n tuottamaa entsyymiä. *P. plagiophthalmus* pystyy kuitenkin tuottamaan valoa vähintään neljällä eri aallonpituudella, joiden emissioipiikit ovat 547 ja 593 nm:n välillä. Esimerkiksi *lucOR*- geenin tuottaa oranssia valoa 595 nm:ssä,

joka pysytään helposti erottamaan *luc*- geenin tuottamasta 560 nm:n valosta (Cebolla et al., 1995). Tämä geeni tuotti kahdesta seitsemän kertaa vähemmän valoa *E. coli*- bakteerissa kuin *luc*, mutta valon tuotto solussa jatkui pidempään. Valon heikkous voi johtua myös siitä, että luminometrinen valon mittausta oli herkempi lyhyemmällä aallonpituuksilla. Siksi sama määrä *lucRO*- lusiferaasin tuottamia fotoneja aiheutti vähemmän mitattavia valoyksiköjä kuin tulikärpäsen entsyymi (Cebolla et al., 1995). Eri *luc*-geenien toiminta vaihteli *R. meliloti*-, *Agrobacterium tumefaciens*-, ja *P. putida*- bakteerilajien välillä (Cebolla et al., 1995).

Vaikka *luc*- geenin käytössä on monia samoja etuja kuin *lux*-geenin käytössä, on sen käyttö bakteerien merkkigeeneinä toistaiseksi ollut vähäistä. Yksi syy tähän voi olla, että geeni on asetettava bakteerissa toimivan promootorin taakse, mikä lisää molekyylibiologisia työvaiheita ja voi olla hankala vähemmän tunnetuilla bakteerilajeilla. Ympäristöseurannassa voidaan *luc*-geenillä ainakin eräissä bakteereissa päästä jopa pienempiin määritysrajoihin kuin *lux*-geenillä. Substraattia on aina lisättävä näytteeseen ennen määrittystä, joten GMM:n mikroympäristö muuttuu määrittäksessä. Tämä estää bakteerin toiminnan tutkimisen luonnollisessa elinympäristössään. Substraatin puuttuminen ympäristöstä pienentää solun rasitetta ja siksi bakteerin asettuminen luonnossa voi toisaalta helpottaa *luc*- geenin käyttöä. Koska *luc*-geeni ei luonnostaan esiinny mikrobipopulaatiossa, muiden positiivisten kantojen ei myöskään pitäisi haitata määrittystä.

5.7 Fluoresenssiin perustuvat merkkigeenit

Fluoresoivat aineet ovat molekyyliä, jotka pidättävät tietyn aallonpituuden säteilyä ja emittoivat säteilyn toisella aallonpituudella. Fenotyyppinen tunnistaminen fluoresenssiin perustuvalla immunologisella määritysmenetelmällä on osoittautunut mahdolliseksi seurantamenetelmäksi. Määrittäksessä hyödynnetään fluoresoivilla aineilla merkittyjen vasta-aineiden sitoutumista tarkoin määriteltäisiin antigeeneihin proteiineihin, jotka sijaitsevat merkityn organismin pinnalla. Siirtämällä 75 emäsparia pitkän osan *E. coli*- bakteerin *caa*- geenistä *phoE*- geeniin, jonka koodaama proteiini muodostaa osan bakteerin ulkoseinän vaippaa, ja liittä-mällä tämä rakenne *P. putida* - kantaan, pystyttiin *P. putida*:n pinnalla ilmentämään *caa*- peptidisekvenssiä. Tämä osa proteiinia oli helposti tunnistettavissa monoklonaalisen vasta-aineen avulla. Näin kokonaisia, yksittäisiä *P. putida*- soluja pystyttiin tunnistamaan epifluoresenssimikroskoopian avulla (Zaat et al., 1994). Tunnistettaessa GMM:n pintaproteiineja, ei eläviä ja kuolleita soluja pystytä erottamaan toisistaan.

Aequorea victoria- meduusasta on eristetty vihreä fluoresoiva proteiini (Gfp= green fluorescent protein), joka pidättää valon sinisiä säteitä ja emittoi vihreää valoa. Merkkigeeninä *gfp*-geenin käyttö on lupaava, sillä tuotettu proteiini on pieni, eikä se muodosta komplekseja. Lisäksi se toimii ilman substraattia ja kofaktoreita (Stearn, 1995). Proteiinista on valmistettu mutantteja, joiden pidätys- tai säteily-aallonpituudet ovat muuttuneet (Delagarve et al., 1995). Näitä mutantteja käyttäen on mahdollista seurata useaa, eri väriproteiinilla merkittyä mikro-organismia samasta näytteestä yhtä aikaa. Vaikka geenin on käytetty paljon geenitoimintojen tutkimiseen ja proteiinileimana sekä soluviljelyssä että monisoluisissa organismeissa, sen käyttö bakteerien merkkigeeninä on toistaiseksi ollut vähäistä. Proteiinia koodaava *gfp*- geeniä on ilmennetty eukarioottisoluissa sekä *E. coli*- ja *B. subtilis*- bakteereissa (Chalie et al., 1994; Webb et al., 1995). Patogeenisen *Mycobacterium smegmatis*- bakteerin on *gfp*-merkkigeeninsä avulla osoitettu infektoivan makrofaageja (Kremer et al., 1995).

Pieninä määrinä fluoresoivia aineita voidaan määrittää vain epifluoresenssimikroskopian avulla. Määrittäminen vaatii siksi kalliin epifluoresenssimikroskooppin käyttämistä ja on usein työlästä. Virussovellutuksissa, missä solu tuottaa suuria määriä viruksen koodaamaa proteiinia, on myös *gfp*-geeniä pystytty seuraamaan paljaalla silmällä (Opaka et al., 1995; Zhang & Melcher, 1995). Fluoresoivaa proteiinia on myös ehdotettu määritettäväksi spektroskopian ja elektroforeesin avulla (Baulcombe et al., 1995). Vaikka geenin toistaiseksi vähäinen käyttö ympäristössä vaikeuttaa arviointia *gfp*-geenin käyttökelpoisuudesta GMM:ien seurannassa, on todennäköistä, että lähitulevaisuudessa *gfp*-geenin käyttö yleistyy myös mikrobiologian tutkimuksessa.

5.8 Fenotyyppiset merkkigeenit raportterigeeneinä ja ekotoksikologiassa

Fenotyyppisiä merkkigeenejä voidaan hyödyntää mikro-organismien ympäristöseurannan lisäksi myös laboratoriotutkimuksissa tutkittaessa geenien toimintaa tai ympäristömyrkyjä. Molekyylibiologisissa tutkimuksissa voidaan tuntemattomien geenien ilmenemistä tutkia lisäämällä tutkittavaan geenisekvenssiin merkkigeeni esimerkiksi transposonimutagenisaation avulla. Merkkigeenin fenotyyppinen ilmentyminen osoittaa tutkittavan geenin toiminnan tietyissä olosuhteissa. Hyödyntäen *cat*-, *lacZ*- ja *gusA*-geeniä, on tämän tyyppisiä tutkimuksia suoritettu jo 1980-luvulla (Stachel et al., 1985; Jefferson et al., 1986).

Nykyään bioluminesenssiin perustuvat tutkimukset ovat suosittuja (Stewart & Williams, 1992). Rihmamaisen *Streptomyces*-bakteerin morfologiaan liittyviä mutantteja (Sohaskey et al., 1992) ja symbionttiseen *Rhizobium*-bakteerin typen sitomiseen tarvittavien geenien ilmentämistä (Cebolla et al., 1991) on tutkittu *lux*-geenien avulla. Naftaleenin hajotusreittiä *P. fluorescens*-bakteerissa on selvitetty *lux*-geenin avulla (Menn et al., 1993). Kun liitettiin *lux*-geeni *P. fluorescens*-kantaan ja eristettiin klooneja, jotka tuottivat valoa typen tai fosforin puutteessa, pystyttiin tutkimaan geenejä, joita solu tarvitsee ravinnepuutteen aikana (Kragelund et al., 1995). Vastaavalla tavalla Civillieri ja Lindow (1994) tutkivat geenejä, jotka solu tarvitsee asettuaan kasvin lehden epäsuotuisalle pinnalle. *B. subtilis*-bakteerissa ilmenettiin *gfp*-geeniä itiöintiin liittyvien geenien yhteydessä, jolloin geeniteknisesti muunnetun itiön solunsisäistä sijaintia pystyttiin määrittämään (Webb et al., 1995).

Myrkyllisten aineiden läsnäolo ympäristönäytteissä voidaan osoittaa fenotyyppisten merkkigeenien avulla. *lux*-merkittyjen *P. fluorescens*-bakteerien tuottama valon määrän huomattiin olevan hyvin herkkä raskasmetallien läsnäoloon. Siksi kanta on sopiva maa- ja vesinäytteiden ekotoksikologisissa määrittäyksissä (Paton et al., 1995). Kun *lux*-geenit liitettiin solun stressigeeneihin, *E. coli*-kanta tuotti valoa näytteen pentakloorifenolin aiheuttaman stressin takia ja kantaa pystyttiin käyttämään pentakloorifenolin biosensorina ympäristönäytteissä (van Dyk et al., 1994). Vastakohtaisella määrittäytävällä, jossa *lux*-geeni sijoitettiin myrkyllisten aineiden hajottavien geenien eteen, *lux*-geeni aktivoitui myrkyllisen aineen läsnäollessa ja solut tuottivat valoa. Näin pystyttiin arvioimaan tolueenin ja naftaleenin biologisia haittavaikutuksia vedessä ja maaperässä (Sanseverino et al., 1993; Burlage et al., 1994).

6

Hiivojen ja sienten tunnistaminen

Tumallisten mikro-organismien perimä on monimutkaisempi ja niiden geenitoiminnan säätely on erilaista kuin tumattomien mikro-organismien (Old & Primrose, 1989). Bakteereista eristettyjä merkkigeenejä ei siksi voida suoraan ilmentää eukarioottisolussa, vaan ne vaativat tumallisten promoottori- ja säätelysekvenssejä. Sieniä on tunnistettu ravinnevaatimuksensa tai myrkkujen sietokykynsä (Hutchison, 1989; 1990) perusteella, sekä DNA koettimilla yksinään (Piskur et al., 1995) tai PCR:ään (RFLP; RAPD, Mehmman et al., 1994; Tommerup et al., 1995; Fabre et al., 1995) yhdistettynä. Valikoivia eristystapoja on kehitetty laboratoriotutkimuksia varten etupäässä siten, että tutkittavasta kannasta on tehty mutantti, joka ei kasva ilman kasvutekijöiden tai hivenaineiden lisäystä. Lisätyssä vektorissa on villityyppinen geeni, joka korvaa mutaation aiheuttaman haitan (van Hartingsveldt et al., 1987; Old & Primrose, 1989). Esimerkiksi LEU2-, HIS3- ja URA3-geeneihin perustuvia valikoivia mutaatioita käytetään yleisesti (Inoue et al., 1993). Lisäämällä kantaan *amdS*-geeni, aikaansaatii kasvua asetamidi ainoana typenlähteenään (Gomi et al., 1992). Nämä valikoivat ominaisuudet perustuvat spontaanimutaatioihin tai geenin siirtoihin saman lajin sisällä, joten kantoja ei voida pitää varsinaisesti geeniteknisesti muunnettuina.

Hyvin karakterisoiduista sienistä on valmistettu geeniteknisesti muunnettuja kantoja. *Aspergillus*- ja *Penicillium*-suvuissa on *lac*-geeniä ilmennetty liittämällä geeni sienen omaan promoottoriin (van Gorcom et al., 1986). Koska luonnon sienikannoissa myös esiintyy *lac*-aktiivisuutta, seuranta luonnon näytteissä ei onnistu tällä merkkigeenillä. Käytettäessä *Aspergillus nidulans*-sienen promoottorisekvenssiä, *gusA*-geeniä pystyttiin ilmentämään *A. nidulans*-, *A. niger*- sekä *Fulvia fulva*-kasvipatogeeneissa. *F. fulva*-kannassa infektiokyky pysyi ennallaan ja *gusA*-geeni ilmennettiin infektion aikana kasvisolukossa (Roberts et al., 1989). Samaa merkkigeeniä on myöhemmin lisätty *Paxillus involutus*-mykorritsasieneen, missä geenituotetta pystyttiin määrittämään uutetun proteiinin värireaktion avulla (Bills et al., 1995). Eukarioottinen, *Aspergillus terreus*-sienestä eristetty BSD-geeni muuttaa solun vastustuskykyiseksi blastisiini S-nimiselle antibiootille. Tätä geeniä on käytetty valikoivana merkkigeeninä *Schizosaccharomyces pombe*-hiivassa ja *Pyricularia oryzae*-sienessä (Kimura et al., 1994). Myös muita antibioottiresistenttisyyttä koodaavia geenejä on käytetty kuten *hph*-geeniä, joka koodaa resistenssiä hygromysiini B:lle (Oliver et al., 1987).

Saccharomyces cerevisiae-hiivaan on lisätty hiirestä eristetty α -amylaasigeeni (Chen et al., 1993). Geeniteknisesti muunnettu kanta oli fenotyypisesti seurattavissa sen tärkkelystä hajoittavan ominaisuuden avulla. Merkkigeeniä pystyttiin ilmentämään myös muissa hiivalajeissa. Todettiin myös, että plasmidiin sijoitettu merkkigeeni ei ollut vakaa, vaan hävisi plasmidin mukanaan pidemmän kasvatuksen jälkeen. Noin 50 sukupolven jälkeen plasmidi oli hävinnyt 90 prosentista soluista. *S. cerevisiae*-hiivasta on eristetty geeni, joka muuttaa solun vastustuskykyiseksi lipidi hydroperoksidille. Koska hiivat yleensä ovat herkkiä aineelle, arveltiin geenin olevan käyttökelpoinen merkkigeeninä muissa hiivoissa (Inoue et al., 1993). Beta-glukuronidaasia tuottava *gusA*-geeni ilmennettiin *S. cerevisiae*-soluissa käyttäen hiivan omaa promoottoria. Geenituotteen määrää pystyttiin arvioimaan vasta, kun soluseinää oli heikennetty, jotta reaktion värimuodostava

substraatti pystyi siirtymään solun sisään (Petering, et al., 1991). Prokarioottinen *lux*-valontuottajageeni on ilmennetty *S. cerevisiae*-hiivassa (Almashanu et al., 1990). Jotta ilmentäminen olisi tehokkempaa, *luxA*- ja *luxB*- geenit yhdistettiin yhdeksi *luxAB*- geeniksi ja geeni siirrettiin plasmidiin hiivan promoottorisekvenssin taakse. Valon alhaisen tuoton hiivassa arveltiin johtuvan FMNH₂- pelkistystekijän alhaisesta määrästä hiivasolussa. Myös *gfp*-geenin fluoresoivaa geenituotetta on ilmentetty hiivassa (Stearns, 1995). *Schizosaccharomyces pombe*-soluja voitiin *gfp*-geenin avulla laskea sekapopulaatiossa, missä vain viisi prosenttia hiivasoluista oli merkitty (Atkins & Izant, 1995).

Kirjallisuuden perusteella merkkigeenejä sienten ja hiivojen seurannan ympäristösovelluksissa ei vielä yleisesti ole käytössä. Useimpia bakteereissa käytettyjä merkkigeenejä voidaan todennäköisesti ilmentää myös eukarioottisoluissa. Nopea kehitys molekyylibiologian alalla sekä sienten monet mahdolliset sovellukset kasvitautien torjunnassa takaavat tutkimuksen jatkumisen ja kiinnostuksen lisääntymisen.

Virukset koostuvat nukleiinihaposta ja proteiiniukuoresta. Nämä yksinkertaiset partikkelit eivät ole aineenvaihdunnallisesti toimivia, eivät ilmennä geenejään, eivätkä pysty monistumaan isäntäorganisminsa ulkopuolella. Lisääntyäkseen viruksen on ruiskutettava nukleiinihapponsa bakteeriin tai eukariottiluun, missä uusia viruspartikkeleita tuotetaan isäntäorganismin lisääntymislaitteistoa käyttäen (Brock et al., 1984). Virukseen lisättyjen, fenotyyppisten merkkigeenien ilmentäminen tapahtuu siis vain isäntäorganismeissa ja siksi geenin toimivuus riippuu siitä, toimivatko geenin promoottori- ja säätelysekvenssit tietyssä isäntäsolussa.

Viruksien genomit ovat vain muutaman sadan kiloemäsparin kokoisia ja usein hyvin karakterisoituja, minkä ansiosta niitä voidaan seurata genotyyppisesti ympäristönäytteistä DNA-koettimilla tai PCR:llä. Geeniteknisesti muunnettuja viruksia on kehitelty jo kauan rokotteisiin, joissa lisättyä antigeeniä ilmentetään viruspartikkelin pinnalla. Nämä voidaan helposti määrittää vasta-aineanalyysin avulla (van Zijl et al., 1990). Käyttämällä kromogeenisiä fenotyyppisiä *gus*- ja *lac*-merkkigeenejä helpotettiin pienten plakkien määrittystä (Gómez-Puertas et al., 1995).

Koska virukset infektoivat hyvin tarkoin määritellyn ryhmän isäntäorganismeja, on bakteriofaageja käytetty bakteerien osoittamiseen ympäristönäytteistä. Käyttäen *lux*-merkittyjä bakteriofaageja, on enterobakteereita onnistuttu osoittamaan teurastamoympäristössä (Kodikara et al., 1991). Neljän tunnin substraattili-säyksen jälkeen oli määritysraja alle kymmenen bakterisolua millilitrassa näytettä. *ina*-geenillä merkityt bakteriofaagien arvellaan myös olevan käyttökelpoisia tunnistessa pieniä bakterimääriä maanäytteistä (Drahos, 1991). *gusA*-geeniä on käytetty fenotyyppisenä merkkigeeninä kasvitautia aiheuttavan viruksen infektion seurantaan kasvisolukossa (Chapman et al., 1992). Määrittäjiä rajoitti lehtien klorofylli, joka osittain peitti värin muodostuksen sekä reaktiotuotteen leviämisen (Jefferson, 1987). Myös *luc*-geeniä on käytetty kasvivirusien seurantaan (Joshi et al., 1990), mutta määrittystä vaikeutti substraatin lisäys ennen määrittystä sekä valon tuoton riippuvuus solun ATP-molekyylien määrästä (Millar et al., 1992).

Liittämällä *gfp*-geeni perunaa infektoivan viruksen X ja tupakkamosaiikki-viruksen kromosomiin pystyttiin seuraamaan viruksen infektioreittiä perunassa ja tupakassa (Baulcombe et al., 1995; Opaka et al., 1995; Zhang & Melcher, 1995). Kun kasvia säteilytettiin UV-valolla pimeässä, pystyttiin infektiokohtia toteamaan paljaalla silmällä. Mikroskoopin avulla pystyttiin tarkkailemaan erillisiä infektoituneita kasvisoluja. Jotta myös metabolisesti inaktiivisia viruspartikkeleita voitaisi osoittaa, rakennettiin fuusioproteiini viruksen proteiiniukuoren koodaavan geenin ja *gfp*-geenin kanssa, jolloin fluoresoivaa proteiinia pystyttiin ilmentämään viruspartikkelin ulkopinnalla. Fluoresenssispektroskopian ja elektroforeesin avulla arveltiin myös kvantitatiivisten määritysten olevan mahdollisia (Baulcombe et al., 1995). Proteiinimäärittystä haittasi kuitenkin kasvisolukon aiheuttama taustafluoresenssi. *gfp*-geenin ilmentäminen havaittiin vasta kaksi päivää infektion jälkeen, kun vastaavasti *gus*-geenituotetta ilmentettiin jo yhden päivän jälkeen.

Kehityksen suunta

Kirjallisuudessa on raportoitu useita käyttökelpoisia tapoja seurata mikro-organismeja luonnossa. Yhteenveto käytetyimpien merkkigeenien ominaisuuksista esitetään taulukossa 2. GMM:ien seurantamenetelmien käyttökelpoisuutta on tut-

Taulukko 2. Vertailu eri merkkigeenien ominaisuuksista.

Merkkigeeni	Signaali	Etuja	Haittoja
<i>inaA</i>	alijäähtyneen veden jäätyminen	herkkä, ei vaadi kasvattamista	hallavaurioiden lisääminen mahdollista
<i>gfp</i>	vihreä fluoresoiva proteiini	vaaraton, ei vaadi substraattia eikä kasvattamista	ei valikoiva
<i>gusA</i>	β -glukuronidaasin tuotto	vaaraton, silmillä havaittavissa, ei vaadi kasvattamista	ei valikoiva, substraatin on tunkeuduttava solun sisään, taustaa
<i>lacZY</i>	β -galaktosidaasin tuotto	vaaraton, joskus valikoiva, määrittäminen mahdollinen usealla menetelmällä	ei herkkä, vaatii kasvatusta, taustaa
<i>luc/lux</i>	lufiferaasin tuotto	herkkä, vaaraton, ei vaadi kasvattamista, määrittäminen mahdollinen usealla menetelmällä	ei valikoiva, taustaa meriympäristössä (<i>lux</i>)
<i>xyIE</i>	katekoli 2,3,-dioksigenaasin tuotto	vaaraton, määrittäminen mahdollinen usealla menetelmällä	ei valikoiva, taustaa, ei herkkä
Antibiootti-resistenttisyys	kasvua antibiootin läsnäollessa	helppo, herkkä, halpa, valikoiva	korkea tausta; riski, että antibioottiresistenttien kantojen määrä kasvaa luonnossa
Myrkyjen sieto	kasvua myrkyn läsnäollessa	valikoiva, herkkä vaaraton	taustaa, vaatii kasvattamista
Koettimet	radioaktiivinen tai ei-radioaktiivinen leima	geenin todellinen läsnäolo myös kuolleissa soluissa tai luonnon kannoissa	tietyissä ympäristöissä ei herkkä, ei tietoa geenitoiminnasta
PCR	monistuneen DNA:n määrittäminen elektroforeesigeelissä tai koettimilla	geenin todellinen läsnäolo myös kuolleissa soluissa tai luonnon kannoissa, hyvin herkkä	ei tietoa geenitoiminnasta, väärin positiivisten riski suuri

kittu etupäässä maaperässä, koska GMM:ja on pääasiassa ehdotettu käytettäväksi maatalouden ympäristösovelluksissa. Geenitekniikalla muunnettuja mikro-organismeja voi kuitenkin joutua myös vesistöihin. Maaperä on vaikeampi ympäristö tutkittaessa GMM:ejä kuin vähän taustabakteereja ja orgaanista aineita sisältävät vesiympäristöt. Maaperässä käytettyjä menetelmiä voidaan ainakin osittain soveltaa vedenpohjan sedimenttikerrostutkimuksissa. Sedimenttitutkimuksessa ongelmat lienevät samantyyppisiä kuin maaperää tutkittaessa.

Alunperin kloonauksen helpottamiseksi GMM:hin lisättyjä, antibioottiresistenssigeenejä on käytetty yleisimmin mikrobien seurannassa ympäristössä. Kun tieto luonnonbakteerien suuresta vaikutuksesta ympäristöön lisättyihin mikrobeihin on lisääntynyt, on siirrytty tutkimaan bakteerien käyttäytymistä ei-steriilissä ympäristössä. Luonnolliset antibioottiresistenttikannat haittaavat kasvatus- ta antibioottiselektiolla ja nostavat määritysrajaa. Tämä ja huoli antibioottiresistenttien bakteerien lisääntymisestä luonnossa ovat vähentäneet antibioottiresistenssigeenien käyttöä merkkigeeneinä luonnossa. Kun maljakasvatuksen todettiin olevan riittämätön elävien solujen määrittämiseen, yleistyvät merkkigeenit, joita voidaan määrittää ilman laboratoriokasvatusta. Näissä määritysmenetelmissä valikoivat merkkigeenit eivät usein ole välttämättömiä, koska luonnon taustabakteeripopulaatio ei yleensä haittaa määritystä.

Sitä mukaa, kun ilman laboratoriokasvatusta määritettävien merkkigeenien käyttö yleistyy GMM:ien seurannassa, ryhdytään kehittämään vielä herkempiä ja helppokäyttöisempiä määritysmenetelmiä ja laitteistoja. Genotyyppiset määritykset ovat tärkeitä, jotta itse muunnetun geenin säilyvyyttä ja siirtymistä muihin organismeihin voidaan tutkia. Jo nyt on olemassa herkkiä menetelmiä, joilla GMM:ja voidaan seurata luonnossa genotyyppinsä perusteella. Genotyyppinen määritys PCR:llä on hyvin herkkä ja sen rajoitukset liittyvät nukleiinihappojen eristystehokkuuteen, käytettyihin mikro-organismeihin ja ympäristön inhiboiiviin aineisiin. Bakteerien fenotyyppiseen seurantaan on valittavissa useita valikoivia ja ei-valikoivia merkkigeenejä, joiden tausta eri ympäristöissä vaihtelee sen mukaan, mistä organismista merkkigeeni on alunperin eristetty. Fenotyyppisillä merkkigeeneillä saadaan tietoa GMM:n elonjäämisestä ja toiminnasta ympäristössä. Tätä tietoa tarvitaan, kun arvioidaan GMM:n vaikutuksia luonnon mikrobeihin ja ympäristön alkuainekiertoihin. Yhdistelemällä valikoivia ja ei-valikoivia menetelmiä voidaan määritys saada herkäksi luonnon taustasta huolimatta. GMM:n käyttäytymistä paikan päällä ympäristössä voidaan mitata vain fenotyyppisillä merkkigeeneillä, joiden geenituotteet toimivat tutkittavassa ympäristössä ja joiden signaalit ovat siellä niin tehokkaita, että ne voidaan havaita ilman näytteen käsittelyä. Toistaiseksi vain yksi kirjallisuudessa esiintyvistä merkkigeeneistä toimii näin.

Kun valitaan merkkigeeniä tietylle organismille, tulisi joka sovellutuksessa huomioida geeniteknisesti muunnettu organismi, tutkittavan ympäristön luonnollinen tausta, määritysmenetelmän soveltuvuus ympäristöön sekä sovelluksen luonne. Yhdistelemällä sopivia määritystapoja voidaan GMM:n kohtalosta luonnossa saada hyvin tarkka kuva.

Sanasto

<i>ATP</i>	adenosiini trifosfaatti; molekyyli, joka sisältää paljon energiaa
<i>auksotrofinen</i>	organismi, joka mutaation takia vaatii kasvutekijöitä kasvuksessa
<i>bakteriofaagi</i>	virus, joka infektoi bakteereita
<i>blottaus</i>	menetelmä, jossa DNA siirretään membraanille hybridisaatiota varten
<i>DNA</i>	deoksiribonukleiinihappo, solun perimä-aines
<i>eksponentiaalinen kasvu</i>	bakteerien kasvuvaihe, jossa solujakautuminen ei riipu ympäristötekijöistä
<i>ELISA</i>	(ELISA= enzyme-linked-immunosorbent assay) proteiinien määrittäminen menetelmä, jossa leimatut vasta-aineet voidaan mitata
<i>fenotyyppi</i>	organismien genotyypistä ja ympäristötekijöistä johtuvat näkyvät ominaisuudet
<i>geenitekniikalla muunneltu</i>	perimäainesta on muunneltu tavalla, joka ei tapahdu luonnollisesti
<i>genotyyppi</i>	organismien geenien koodaamat ominaisuudet
<i>insertiosekvenssi</i>	nukleiinisekvenssi, joka aikaansaa oman siirtymisensä perimässä
<i>isäntäbakteeri</i>	muokkaamaton luonnon bakteeri, jonka genomia voidaan muokata geeniteknisesti
<i>homologinen</i>	vastaava, samankaltainen
<i>hybridisaatio</i>	menetelmä, jossa kaksi eri alkuperää olevat yksijuosteiset DNA-säikeet yhdistyvät kaksijuosteiseksi DNA:ksi
<i>kloonaus</i>	DNA- osien kopiointi plasmidien tai bakteriofaagien avulla
<i>koetin</i>	pala nukleiinihappoa, jonka avulla samankaltaista geenisekvenssiä voidaan todeta näytteestä

<i>konjugaatio</i>	perimä-aineksen siirtyminen solusta toiseen suoran solukontaktin välityksellä
<i>kromosomi</i>	rakenne, joka sisältää perimä-aineksen
<i>maljaus</i>	suspension bakteerien lukumäärän määrittäminen kasvattamalla kiinteällä ravintoalustalla
<i>mikrobi</i>	mikro-organismi
<i>mikro-organismi</i>	tumallinen tai tumaton mikrobiologinen kokonaisuus, joka pystyy monistumaan
<i>MPN-menetelmä</i>	(MPN= most probable number), bakteerien lukumäärän arviointi näytettä laimentamalla niin paljon, että yhdessä osanäytteessä on korkeintaan yksi solu. Tutkimalla, esiintyykö osanäytteissä bakteereita kasvatuksen jälkeen, voidaan bakteerien todennäköinen lukumäärä koko näytteessä arvioida
<i>mutaatio</i>	äkkinäinen perinnöllinen muutos organismin perimä-aineksessa
<i>PCR</i>	(PCR= polymerase-chain reaction) kemiallinen reaktiosarja, jossa nukleiinihappoja voidaan tehokkaasti monistaa ilman solukasvatuksia
<i>plakki</i>	viruksien aiheuttama kirkas alue bakteerimaljalla
<i>plasmidi</i>	ei-kromosomaalinen perimä-aines, joka monistuu itsenäisesti eikä ole elintärkeä organismille
<i>pmy</i>	pesäkettä muodostava yksikkö; maljauksen tuloksen suure, joka kuvaa näytteen kasvatettavaa solumäärää
<i>promoottori</i>	kohta DNA-juosteessa ennen geenin alkua, johon RNA- polymeeraasi sitoutuu proteiinisynteesissä
<i>prototrofinen</i>	organismi, joka ei tarvitse kasvutekijöitä kasvatukseen (vt. auktotrofinen)
<i>raportteri</i>	tunnettu, geeniteknisesti lisätty geeni, jonka avulla tutkitaan tuntemattomien geenien toimintaa solussa
<i>rekombinaatio</i>	prosessi, jossa kahdesta eri genomista peräisin olevat rakennosat muuttuvat yhdeksi yksiköksi
<i>restriktioentsyymi</i>	endonukleasi, joka pilkkoo DNA:ta juosteen tietyssä emäsparikoodin kohdassa
<i>ribosomi</i>	proteiinituotantoon tarvittava RNA-proteiinikompleksi, joka esiintyy yleisesti solussa
<i>RNA</i>	ribonukleiinihappo; välttämätön yhdiste proteiinisynteesissä

<i>segregaatio</i>	plasmidin häviäminen solusta viallisen jakautumisen johdosta
<i>transduktio</i>	perimä-aineksen siirtyminen viruksien välityksellä solusta toiseen
<i>transformaatio</i>	solusta vapautuneen perimä-aineksen siirtyminen toiseen soluun
<i>transposoni</i>	itsestään siirtyvä DNA:n osa, jonka kummassakin päässä on insertiosekvenssi
<i>villityyppinen</i>	muokkaamaton, luonnollinen

Kiitokset

Kiitän kommenteista ja korjausehdotuksista Tiina Huviota Ympäristöministeriöstä, Kirsten Jörgenseniä ja Minna Lainetta Suomen ympäristökeskuksesta sekä Nina Klingerää Helsingin yliopiston biotieteiden laitoksesta. Kiitokset myös Maksim Konarolle ja Matti Pietarilalle Suomen ympäristökeskuksen tietopalvelusta tietojen hausta ja julkaisujen toimittamisesta.

Sammanfattning

Användning av markörgener för uppföljning av gentekniskt modifierade mikroorganismer i omgivningen

Noggranna undersökningar, både i laboratorieförhållanden och i naturefterliknande modellsystem, är nödvändiga, om man vill utesluta oväntade effekter av till naturen tillsatta gentekniskt modifierade mikroorganismer. De till omgivningen tillsatta organismerna kan märkas med en specifik DNA -sekvens för att underlätta urskiljningen från de naturliga mikroberna. Denna rapport utgör en överblick av litteraturen om markörgener som använts för att följa upp mikroorganismer i öppna, naturefterliknande system. Användningen av markörgener för effektiv uppföljning av gentekniskt modifierade mikroorganismer utreds, likaså deras användning för uppskattning av mikroorganismers aktivitet i omgivningen.

Vid uppföljning och identifiering av gentekniskt modifierade mikroorganismer i naturen bör markörgenens signal vara stark och lätt att mäta. Signalen måste vara unik i den miljö som undersöks och den tillsatta gensekvensen får inte vara en börda för värdorganismen. Genkonstruktionen bör vara stabil i cellen och inte överföras till andra i naturen förekommande organismer.

Den tillsatta gensekvensens stabilitet i cellen och dess förmåga att spridas till andra organismer i naturen påverkas väsentligt av den metod med vilken markörgenen insätts i mikrobens arvsmaterial. Markörgener på plasmidvektorer sprids lättare till omgivningens mikroorganismer och är mindre stabila i organismen än direkt till kromosomen tillsatta gener.

Uppföljning av mikroorganismens arvsmaterial är väsentlig för att klargöra hur länge den tillsatta organismen existerar i omgivningen och huruvida de tillsatta generna kan överföras till den naturliga mikrobpopulationen. Markörgenens DNA-sekvens kan spåras i miljön med hjälp av DNA sonder och PCR. Förutom signaler från levande, aktiva celler erhålls också signaler från markörgener i döda celler, från märkt frigivet DNA eller från märkt DNA som överförts till omgivningens mikroorganismer. Dessa metoder ger ingen information om de modifierade mikroorganismernas aktivitet i miljön.

DNA-analys kräver att nukleinsyrorna isoleras och ofta noggrant renas före mätning. I naturliga system är detta ofta problematiskt, eftersom humusämnen och lerpartiklar effektivt binds till DNA. Med noggrann optimering av arbetsmetoderna har dock mycket känsliga detektionssystem utvecklats för flera vatten- och markmiljöer. I de flesta fall erhålls en acceptabel detektionsnivå endast om användning av sond kombineras med PCR- metoder.

De aktiva organismernas andel är av avgörande betydelse i riskanalys av gentekniskt modifierade mikroorganismer, eftersom dessa mest effektivt kan komma att påverka den naturliga mikrobiologiska florin och grundämnenas kretslopp i miljön. Andelen levande aktiva mikrober kan uppföljas med markörgener vilka ger värdorganismen nya mätbara egenskaper som de naturliga organismerna saknar. Många av dessa egenskaper är selektiva och därför kan märkta, aktiva

mikroorganismer ofta lätt spåras genom laboratorieodling. I litteraturen beskrivs selektiva markörgener som ger värdorganismen resistens mot antibiotika, herbicider eller tungmetaller.

Genetiskt modifierade mikroorganismer vars markörgener inte är selektiva är ofta svårare att mäta genom laboratorieodling, eftersom naturens mikrober kan hindra uppkomsten av synliga kolonier på skål. Till exempel *lacZY*, *xylE* och *gusA* -markörgenernas proteinprodukter är metaboliska enzymer, som vid tillsats av substrat producerar en färgad slutprodukt. Denna produkt kan mätas genom en färgförändring i odlade celler, genom att påvisa enzymet spektrofotometriskt eller immunologiskt. En annan grupp av icke-selektiva markörgener består av generna *lux* och *luc*. Dessa geners proteinprodukter producerar ljus. Detta ljus kan observeras med bara ögat, genom exponering av röntgenfilm eller kvantitativt med en bioluminometer.

Naturliga mikroorganismer med liknande egenskaper som de som analyseras försvårar uppföljningen och höjer detektionsnivån. Genom att kombinera flera markörgener på ett sätt som inte är vanligt i naturen kan detektionsnivån ofta sänkas. Tidiga undersökningar av bakterier i naturefterliknande system utfördes med markörgener som ger resistens mot antibiotika och i många fall var markör-genen placerad på plasmidvektorer. På senare år har användningen av antibiotikaresistentgener som markörgener minskat, både på grund av den stora mängden naturligt förekommande antibiotikaresistenta mikroorganismer och på grund av den potentiella hälsorisk som antibiotikaresistentgener i naturen utgör.

Användningen av markörgener som inte är selektiva blir allt vanligare. Eftersom dessa markörgener uppföljs genom andra mätningmetoder än odling på skål, stör de naturliga mikroorganismerna sällan mätningen. Uppföljningsmetoder som inte kräver laboratorieodling, kan användas för att observera celler i vilostadium. En stor del av de mikrober som tillsätts miljön övergår till ett vilostadium, där synlig aktivitet saknas. Dessa celler är levande och aktiveras när förhållandena blir gynnsamma.

Det finns ett stort urval av markörgener som lämpar sig för användning i olika miljöer och för olika typ av uppföljning. För en grundlig riskanalys fordras information om den totala mängden celler i miljön, om andelen döda och icke-odlingsbara celler, samt om de levande cellernas aktivitet. Information behövs också om den gentekniskt modifierade genens möjliga spridning till den naturliga floran och arvmaterialets varaktighet utanför cellen. Därför behövs uppföljning både av den modifierade gensekvensen och av hela mikroorganismen.

Vilken markör-gen som lämpar sig bäst för studier i ett visst system beror på många delfaktorer, och den bör därför väljas skilt för sig för varje tillämpning. Vilken markör-gen som är optimal beror på vilken mikroorganism som ska uppföljas, vilka egenskaper den naturliga mikrobfloran har, om bestämningssmetoden kan användas i denna miljö, samt typen av tillämpning. Genom att kombinera olika typer av bestämningssätt kan man i flera miljöer få en klar bild av tillsatta mikroorganismers öde i omgivningen.

Kirjallisuus

- Adams, M. R., Grubb, S. M., Hamer, A. & Clifford, M. N. 1990. Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on β -glucuronidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2021-2024.
- Ahmad, K. A. & Stewart, G. S. A. B. 1991. The production of bioluminescent lactic acid bacteria suitable for the rapid assessment of starter culture activity in milk. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 113-120.
- Almashanu, S., Musafia, B., Hadar, R., Suissa, M., & Kuhn, J. 1990. Fusion of *luxA* and *luxB* and its expression in *E. coli*, *S. cerevisiae* and *D. melanogaster*. *J. Biolumin. Chemilumin.*, 5, 89-97.
- Amin-Hanjani, S., Meikle, A., Glover, L. A., Prosser, J. I., & Killham, K. 1993. Plasmid and chromosomally encoded luminescence marker systems for detection of *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Mol. Ecol.*, 2, 47-54.
- Atkins, D. & Izant, J. G. 1995. Expression and analysis of the green fluorescent protein gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.*, 28, 585-588.
- Atlas, R. M. 1992. Molecular methods for environmental monitoring and containment of genetically engineered microorganisms. *Biodegr.*, 3, 137-146.
- Avilés, M., Cordina, J. C., Pérez-García, A., Cazorla, F., Romero, P. & de Vicente, A. 1993. Occurrence of resistance to antibiotics and metals and of plasmids in bacterial strains isolated from marine environments. *Wat. Sci. Tech.*, 27, 475-478.
- Bailey, M. J., Lilley, A. K., Thompson, I. P., Rainey, P. B. & Ellis, R. J. 1995. Site directed chromosomal marking of a fluorescent pseudomonad isolated from the phytosphere of sugar beet; stability and potential for marker gene transfer. *Mol. Ecol.*, 4, 755-763.
- Bale, M. J., Fry, J. C. & Day, M. J. 1987. Plasmid transfer between strains of *Pseudomonas aeruginosa* on membrane filters attached to river stones. *J. Gen. Microbiol.*, 133, 3099-3107.
- Barkay, T., Liebert, C. & Gillman, M. 1993. Conjugal gene transfer to aquatic bacteria detected by the generation of a new phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 807-814.
- Baulcombe, D. C., Chapman, S. & Cruz, S. S. 1995. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.*, 7, 1045-1053.
- Beauchamp, C. J., Kloepper, J. W. & Lemke, P. A. 1993. Luminometric analyses of plant root colonization by luminescent pseudomonads. *Can. J. Microbiol.*, 39, 434-441.
- Bej, A. K., Steffan, R. J., DiCesare, J., Haff, L. & Atlas, R. M. 1990. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 307-314.
- Bej, A. K., DiCesare, J. L., Haff, L. & Atlas, R. M. 1991a. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uidA*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1013-1017.
- Bej, A. K., Mahbubani, M. H., Dicesare, J. L. & Atlas, R. M. 1991b. Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3529-3534.
- Bennerova, M. V. & Crowley, D. E. 1994. Direct detection of rhizosphere-colonizing *Pseudomonas* sp. using an *Escherichia coli* rRNA promoter in a Tn7-*lux* system. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 14, 319-330.
- Berg C. M., Berg, D. E. & Groisman, E. A. 1989. Transposable elements and the genetic engineering of bacteria, pp.879-926. Kirjassa: D. E. Berg & M. M. Howe (ed.), *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Bills, S. N., Richter, D. L. & Podila, G. K. 1995. Genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* by particle bombardment. *Mycol. Res.*, 99, 557-561.

- Björklöf, K., Suoniemi, A., Haahtela K. & Romantschuk, M. 1995. High frequency of conjugation versus plasmid segregation of RP1 in epiphytic *Pseudomonas syringae* populations *Microbiol.*, 141, 2719-2727.
- Boelens, J., Campell, J., Verstraete, W. & Paranchych, W. 1993. The use of bioluminescence as a reporter to study the adherence of the plant growth promoting rhizopseudomonads 7NSK2 and ANP15 to canola roots. *Can. J. Microbiol.*, 39, 329-334.
- Brock, T. D., Smith, D. M. & Madigan, M. T. 1984. *Biology of microorganisms*. 4: s painos. Prentice/Hall International, Inc., London.
- Burlage, R. S., Palumbo, A. V., Heitzer, A. & Sayler, G. 1994. Bioluminescent reporter bacteria detect contaminants in soil samples. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 45/46, 731-740.
- Campell, A. P. 1989. Living light: biochemistry, function and biomedical applications. *Essays in Biochemistry*, 24, 41-81.
- Caulcott, C. A., Dunn, A., Robertson, H. A., Cooper, N. S., Brown, M. E. & Rhodes, P. M. 1987. Investigation of the effect of growth environment on the stability of low-copy-number plasmids in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 133, 1881-1889.
- Cebolla, A., Ruiz-Berraquero, F. & Palomares, A. J. 1991. Expression and quantification of firefly luciferase under control of *Rhizobium meliloti* symbiotic promoters. *J. Biolum. Chemilum.*, 6, 177-184.
- Cebolla, A., Ruiz-Berraquero, F. & Palomares, A. J. 1993. Stable tagging of *Rhizobium meliloti* with the firefly luciferase gene for environmental monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2511-2519.
- Cebolla, A., Vazquez, M. E. & Palomares, A. J. 1995. Expression vectors for the use of eukaryotic luciferases as bacterial markers with different colors of luminescence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 660-668.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263, 802-804.
- Chamier, B., Lorenz, M. G. & Wackernagel, W. 1993. Natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* by plasmid DNA adsorbed on sand and groundwater aquifer material. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1662-1667.
- Chapman, S., Kavanagh, T. & Baulcombe, D. C. 1992. Potato virus X as a vector of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochemistry*, 32, 1212-1218.
- Chaudhry, G. R., Toranzos, G. A. & Bhatti, A. R. 1989. Novel method for monitoring genetically engineered microorganisms in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1301-1304.
- Chen, C., Mobley, H. L. T. & Rosen, B. P. 1985. Separate resistances to arsenate and arsenite (antimonate) encoded by the arsenical resistance operon of R factor R773. *J. Bacteriol.*, 161, 758-763.
- Chen, D. C., Yang, B. C., Chow, C. W. & Kuo, T. T. 1993. α -amylase as a marker for evaluating the stability of a recombinant yeast in long-term cultivation. *J. Bacteriol.*, 29, 329-334.
- Cirvilleri, G. & Lindow, S. E. 1994. Differential expression of genes of *Pseudomonas syringae* on leaves and in culture evaluated with random genomic *lux* fusions. *Mol. Ecol.*, 3, 249-257.
- Clegg, C. D., van Elsas, J. D., Anderson, J. M. & Lappin-Scott, H. M. 1994. Assessment of the role of a terrestrial isopod in the survival of a genetically modified pseudomonad and its detection using polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 15, 161-168.
- Comai, L., Sen, L., C. & Stalker, D. M. 1983. An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. *Science*, 221, 370-371.
- Compeau, G., Al-Achi, B. J., Platsouka, E. & Levy, S. B. 1988. Survival of rifampicin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2432-2438.
- Contreras, A., Molin, S. & Ramos, J. L. 1991. Conditional-suicide containment system for bacteria which mineralize aromatics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1504-1508.
- Cook, N., Silcock, D. J., Waterhouse, R. N., Prosser, J. I., Glover, L. A. & Killham, K. 1993. Construction and detection of bioluminescent strain of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 350-359.
- Courvalin, P. 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, 38, 1447-1451.

- Cresswell, N., Herron, P. R., Sauders, V. A. & Wellington, E. M. H. 1992. The fate of introduced streptomycetes, plasmid and phage populations in a dynamic soil system. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 659-666.
- Cresswell, A., Skot, L. & Cookson, A. R. 1994. The construction, detection and use of bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* strains. *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 656-665.
- Dane, F. & Shaw, J. 1994. Endophytic and epiphytic growth of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on susceptible and resistant host plants in the field environment: detection by bioluminescence. *Microb. Rel.*, 2, 223-229.
- Delagrave, S., Hawtin, R. E., Silva, C. M., Yang, M. M. & Youvan, D. C. 1995. Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *Bio/technology*, 13, 151-154.
- DeLuca, M. & McElroy, W. D. 1978. Purification and properties of firefly luciferase. *Meth. Enzymol.*, 57, 3-15.
- Desmonts, C., Minet, J., Colwell, R. & Cormier, M. 1990. Fluorescent-antibody method useful for detecting viable but nonculturable *Salmonella* spp. in chlorinated wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1448-1452.
- Devanas, M. A., Rafaeli-Eshkol, D. & Stotzky, G. 1986. Survival of plasmid-containing strains of *Escherichia coli* in soil: effect of plasmid size and nutrients on survival of host and maintenance of plasmids. *Curr. Microbiol.*, 13, 269-277.
- Dijkmans, R., Jagers, A. & Kreps, S. 1993. Rapid method for purification of soil DNA for hybridization and PCR analysis. *Microb. Rel.*, 2, 29-34.
- Drahos, D., Hemming, B. & McPherson, S. 1986. Tracking recombinant organisms in the environment: -Galactosidase as a selectable non-antibiotic marker for fluorescent *Pseudomonas* monads. *Bio/Tech.*, 4, 439-444.
- Drahos, D. J. 1991. Methods for the detection, identification, and enumeration of microbes. p.135-157. Kirjassa: J. H. Andrews & S. S. Hirano (ed.), *Microbial ecology of leaves*. Brock/Springers Series in Contemporary Bioscience. Springer-Verlag, New York.
- Duncan, S., Glover, L., Killham, K. & Prosser, J. 1994. Luminescence-based detection of activity of starved and viable but nonculturable bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1308-1316.
- van Elsas, J. D., Trevors, J. T. & Starodub, M. E. 1988. Bacterial conjugation between pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 53, 299-306.
- van Elsas, J., & Waalwijk, C. 1991. Methods for the detection of specific bacteria and their genes in soil. *Agricult., Ecosys. Environ.*, 34, 97-105.
- van Elsas, J. D., van Overbeek, L. S. & Fouchier, R. 1991. A specific marker, *pat*, for studying the fate of introduced bacteria and their DNA in soil using a combination of detection techniques. *Plant and Soil*, 138, 49-60.
- Fedi, S., Brazil, D., Dowling, D. N., and O'Gara, F. 1996. Construction of a modified mini-Tn5 *lacZY* non-antibiotic marker cassette: ecological evaluation of a *lacZY* marked *Pseudomonas* strain in the sugarbeet rhizosphere. *FEMS Microbiol. Lett.*, 135, 251-257.
- Fitzgibbon, J. E. & Braymer, H. D. 1990. Cloning of a gene from *Pseudomonas* sp. strain PG2982 conferring increased glyphosate resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3382-3388.
- Flemming, C. A., Leung, K. T., Lee, H., Trevors, J. T. & Greer, C. W. 1994a. Survival of *lux-lac*-marked biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* UG2L in soil monitored by nonselective plating and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1606-1613.
- Flemming, C. A., Lee, H. & Trevors, J. T. 1994b. Bioluminescent most-probable-number method to enumerate *lux*-marked *Pseudomonas aeruginosa* UG2Lr in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3458-3461.
- Ford, S. & Olson, B. H. 1988. Methods for detecting genetically engineered microorganisms in the environment. *Adv. Microb. Ecol.*, 47-79.
- Fravel, D. R., Lumsden, R. D., & Roberts, D. P. 1990. *In situ* visualization of the biocontrol rhizobacterium *Enterobacter cloacae* with bioluminescence. *Plant and Soil*, 125, 233-238.
- Frischer, M. E., Thurmond, J. M., & Paul, J. H. 1990. Natural plasmid transformation in a high-frequency-of-transformation marine *Vibrio* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3439-3444.
- Frischer, M. E., Stewart, G. J., & Paul, J. H. 1994. Plasmid transfer to indigenous marine bacterial populations by natural transformation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 15, 127-136.
- Gealt, M. A., Chai, M. D., Alpert, K. B. & Boyers, J. C. 1985. Transfer of plasmids pBR322 and pBR3254 in wastewater from laboratory strains of *Escherichia coli* to bacteria indigenous to the waste disposal systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 836-841.

- Giacomini, A., Olivero, F. J., Aquarini, A. & Nuti, M. F. 1994. Construction of multipurpose gene cartridges based on a novel synthetic promoter for high-level genes expression in gram-negative bacteria. *Gene*, 144, 17-24.
- Gillespie, K. M., Angle, J. S. & Hill, R. L. 1995. Runoff losses of *Pseudomonas aureofaciens* (*lacZY*) from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17, 239-246.
- Godwin, D. & Slater, J. H. 1979. The influence of the growth environment on the stability of a drug resistance plasmid in *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.*, 111, 201-210.
- Gomi, K., Kitamoto, K. & Kumagai, C. 1992. Transformation of the industrial strain of *Aspergillus oryzae* with the homologous *amdS* gene as a dominant selectable marker. *J. Ferm. Bioeng.*, 27, 389-391.
- Goodman, A. E., Hild, E., Marshall, K. C. & Hermansson, M. 1993. Conjugative plasmid transfer between bacteria under simulated marine oligotrophic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1035-1040.
- van Gorcom, R. F. M., Punt, P. J., Pouwels, P. H. & van den Hondel, C. A. M. J. J., 1986. A system for the analysis of expression signals in *Aspergillus*. *Gene*, 48, 211-217.
- Gómez-Puertas, P., Rodríguez, F., Ortega, A., Oviedo, J. M., Alonso, C. & Escribano, J. M. 1995. Improvement of African swine fever virus neutralization assay using recombinant viruses expressing chromogenic marker genes. *J. Vir. Meth.*, 55, 271-279.
- Grant, F. A., Glover, L. A., Killham, K. & Prosser, J. I. 1991. Luminescence-based viable cell enumeration of *Erwinia carotovora* in the soil. *Soil Biol. Biochem.*, 23, 1021-1024.
- Grant, F. A., Prosser, J. I., Killham, K. & Glover, L. A. 1992. Luminescence based detection of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 24, 961-967.
- Griffin, H. G., Foster, T. J., Silver, S. & Misra, T. K., 1987. Cloning and DNA sequence of the mercuric- and organomercurial-resistance determinants of plasmid pDU1358. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3112-3116.
- Gustafson K. & Jansson, J. K. 1993. Ecological risk assessment of the deliberate release of genetically modified microorganisms. *Ambio*, 22, 236-242.
- Hansen, W. & Yourassowsky, E. 1984. Detection of β -glucuronidase in lactose-fermenting members of the family *Enterobacteriaceae* and its presence in bacterial urine cultures. *J. Clin. Microbiol.*, 20, 1177-1179.
- van Hartingsveldt, W., Mattern, I. E., van Zeijl, C. M. J., Pouwels, P. H. & van den Hondel, C. A. M. J. J., 1987. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Mol. Gen. Genet.*, 206, 71-75.
- Hassani, L., Imzilen, B., Boussaid, A. & Gauthier, M. J. 1992. Seasonal incidence of and antibiotic resistance among *Aeromonas* species isolated from domestic wastewater before and after treatment in stabilization ponds. *Microb. Ecol.*, 23, 227-237.
- Henis, Y., 1987. *Survival and dormancy of bacteria*. 105 p. John Wiley & Son, New York.
- Henschke, R. B., Nücken, E. & Schhmidt, R. F. J. 1989. Fate and dispersal of recombinant bacteria in soil microcosm containing the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Biol. Fertil. Soils*, 7, 374-376.
- Henschke, R., Henschke, E. & Schmidt, F. 1991. Monitoring survival and gene transfer in soil microcosms of recombinant *Escherichia coli* designed to represent an industrial production strain. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 35, 247-252.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 172, 6557-6567.
- Hill, K. E., Fry, J. C. & Weightman, A. J. 1994. Gene transfer in the aquatic environment: persistence and mobilization of the catabolic recombinant plasmid pD10 in the epilithon. *Microbiol.*, 140, 1555-1563.
- Hutchinson, L. J. 1989. Studies on the systematics of ectomycorrhizal fungi in axenic culture. IV. The effect of some selected fungitoxic compounds upon linear growth. *Can. J. Bot.*, 68, 2172-2178.
- Hutchison, L. J. 1990. Studies on the systematics of ectomycorrhizal fungi in axenic culture. II. The enzymatic degradation of selected carbon and nitrogen compounds. *Can. J. Bot.*, 68, 1522-1530.
- Hwang, I. & Farrand, S. 1994. A novel gene tag for identifying microorganisms released into the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 913-920.
- Höfte, M., Mergeay, M. & Verstraete, W. 1990. Marking the *Rhizopseudomonas* strain 7NSK₂ with a μ d(*lac*) element for ecological studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1046-1052.

- Inoue, Y., Kobayashi, S., Yoshikawa, K., Tran, L.-T. & Kimura, A. 1993. Lipid hydroperoxide-resistance gene in *Saccharomyces cerevisiae*: utilization as a selectable marker gene for yeast transformation. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17, 305-310.
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M. & Hirsh, D. 1986. -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 8447-8451.
- Jensen, L. B., Ramos, J. L., Kaneva, Z. & Molin, S. 1993. A substrate-dependent biological containment system for *Pseudomonas putida* based on the *Escherichia coli* *gef* gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3713-3717.
- Joshi, R. L., Joshi, V. & Ow, D. W., 1990. BSMW genome mediated expression of a foreign gene in dicot and monocot plant cells. *EMBO J.*, 9, 2663-2669.
- Kaniga, K., Sory, M.-P., Delor, I., Saegermen, C., Limet, J. N. & Cornelis, G. R. 1992. Monitoring of *Yersinia enterocolitica* in murine and bovine feces on the basis of the chromosomally integrated *luxAB* marker gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1024-1026.
- Karn, J., Brenner, S., Barret, L. & Ceasari, G. 1980. Novel bacteriophage cloning vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5172-5176.
- Katupitiya, S., New, P. B., Elmerich, C. & Kennedy, I. R. 1995. Improved N₂ fixation in 2,4-D treated wheat roots associated with *Azospirillum lipoferum*: studies of colonization using reporter genes. *Soil Biol. Biochem.*, 27, 447-452.
- Kidambi, S. P., Ripp, S. & Miller, R. V. 1994. Evidence for phage-mediated gene transfer among *Pseudomonas aeruginosa* strains on the phylloplane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 496-500.
- Kimura, M., Kamakura, T., Tao, Q. Z., Kaneko, I. & Yamaguchi, I. 1994. Cloning of the blastidin S deaminase gene (BSD) from *Aspergillus terreus* and its use as a selectable marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*. *Mol. Gen. Genet.*, 242, 121-129.
- King, R. J., Short, K. A. & Seidler, R. J. 1991. Assay for detection and enumeration of genetically engineered microorganisms which is based on the activity of a deregulated 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1790-1792.
- Kluepfel, D. A., Klinge, E. L., Skipper, H. D., Hughes, T. A., Gooden, D. T., Drahos, D. J., Barry, G. F., Hemming, B. C. & Brandt, E. J. 1991. The release and tracking of genetically engineered bacteria in the environment. *Phytopathol.*, 81, 348-352.
- Kodikara, C. P., Crew, H. H. & Stewart, G. S. A. B. 1991. Near on-line detection of enteric bacteria using *lux* recombinant bacteriophage. *FEMS Microbiology Letters*, 83, 261-266.
- Kogure, K., Simidu, U. & Taga, N. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 25, 415-420.
- Kokjohn, T. A., 1989. Transduction: mechanisms and potential for gene transfer in the environment. Kirjassa: S. B. Levy & R. V. Miller (ed.), *Gene transfer in the environment*, p.73-97. McGraw-Hill Publishing Company, New York.
- Koncz, C., Langridge, W. H. R., Olsson, O., Schell, J. & Szalay, A. A. 1990. Bacterial and firefly luciferase genes in transgenic plants: advantages and disadvantages of a reporter gene. *Develop. Gen.*, 11, 224-232.
- Kragelund, L., Christoffersen, B., Nybroe, O. & De-Bruijn, F. J. 1995. Isolation of *lux* reporter gene fusions in *Pseudomonas fluorescens* DF57 inducible by nitrogen or phosphorus starvation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17, 95-106.
- Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Poulain-Godefroy, O. & Locht, C. 1995. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. *Mol. Microbiol.*, 17, 913-922.
- Lampinen, J., Koivisto, L., Wahlsten, M., Mäntsälä, P. & Karp, M. 1992. Expression of luciferase genes from different origins in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, 232, 498-504.
- Lebaron, P., Batailler, N. & Baleux, B. 1994. Mobilization of a recombinant nonconjugative plasmid at the interface between wastewater and the marine coastal environment. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 15, 61-70.
- de Leij, F. A. A. M., Bailey, M. J., Whipps, J. M. & Lynch, J. M. 1993. A simple most probable number technique for the sensitive recovery of a genetically-modified *Pseudomonas aureofaciens* from soil. *Lett. Appl. Microbiol.*, 16, 307-310.
- de Leij, F. A. A., E. J. Sutton, Whipps, J. M., Fenlon, J. S. & Lynch, J. M. 1995. Impact of field release of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on indigenous microbial populations of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3443-3453.
- Leser, T. D. 1995. Quantification of *Pseudomonas* sp. strain B13(FR1) in the marine environment by competitive polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Meth.*, 22, 249-262.

- Leung, K., Trevors, J. T. & Lee, H. 1995. Survival of and *lacZ* expression in recombinant *Pseudomonas* strains introduced into river water microcosms. *Can. J. Microbiol.*, 41, 461-469.
- Lilley, A. K., Fry, J. C., Day, M. J. & Bailey, M. J. 1994. *In situ* transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp. in sugar beet rhizosphere. *Microbiol.*, 140, 27-33.
- Lindgren, P. B., Frederick, R., Govindarajan, A. G., Panopoulos, N. J., Staskawics, B. J. & Lindow, S. E. 1989. An ice nucleation reporter gene system: identification of inducible pathogenicity genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *EMBO J.*, 8, 1591-1301.
- Lindow & Panopoulos, N. J. 1988. Field tests of recombinant Ice⁻ *Pseudomonas syringae* for biological frost control in potato. Kirjassa: Release of genetically engineered micro-organisms, Academic Press.
- Lindström, K., Lipsanen, P. & Kaijalainen, S. 1990. Stability markers used for identification of two *Rhizobium galegae* inoculant strain after five years in the field. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 444-450.
- Lorenz, M. G., Gerjets, D., & Wackernagel, W. 1991. Release of transforming plasmid and chromosomal DNA from two cultured soil bacteria. *Arch. Microbiol.*, 156, 319-326.
- Lorenz, M. G., Reipschläger, K. & Wackernagel, W. 1992. Plasmid transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in non-sterile soil extract and groundwater. *Arch. Microbiol.*, 157, 355-360.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. & Timmis, K. 1990. Mini-Tn5 transposon vectors derivatives for insertion mutagenesis, promotor probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative Eubacteria. *J. Bact.*, 172, 6568-6572.
- de Lorenzo, V. & Timmis, K. 1992. Specialized host vector systems for the engineering of *Pseudomonas* strains destined for environmental release.
- de Lorenzo, V. 1994. Genetic strategies to engineer expression systems responsive to relevant environmental signals. Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms., F. O'Gara, D. N. Dowling, and B. Boesten, eds., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 91-101.
- Magee, A. M. & Quinn, J. P. 1991. Antibiotic resistance in the bacteria of a remote upland river catchment. *Lett. Appl. Microbiol.*, 13, 145-149.
- Massa, S., Petruccioli, M., Fanelli, M. & Gori, L. 1995. Drug resistant bacteria in non carbonated mineral waters. *Microbiol. Res.*, 150, 403.
- McCeon, D. M., Calabresse, J. P. & Bissonnettes, G. K. 1995. Antibiotic resistant gram-negative bacteria in rural ground water supplies. *Wat. Res.*, 29, 1902-1908.
- McClure, N. C., Fry, J. C., & Weightman, A. J. 1991. Survival and catabolic activity of natural and genetically engineered bacteria in laboratory-scale activated-sludge unit. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 366-373.
- Mehmann, B., Brunner, I. & Braus, G. H. 1994. Nucleotide sequence variation of chitin synthase genes among ectomycorrhizal fungi and its potential use in taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3105-3111.
- Meighen, E. A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.*, 55, 123-142.
- Meikle, A., Killham, K., Prosser, J. I. & Glover, L. A. 1992. Luminometric measurement of population activity of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* in the soil. *FEMS Microbiol. Lett.*, 99, 217-220.
- Meikle, A., Glover, L. A., Killham, K. & Prosser, J. I. 1994. Potential luminescence as an indicator of activation of genetically-modified *Pseudomonas fluorescens* in liquid culture and in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 26, 747-755.
- Meikle, A., Amin-Hanjani, S., Glover, L. A., Killham, K. & Prosser, J. I. 1995. Matric potential and the survival and activity of a *Pseudomonas fluorescens* inoculum in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 27, 881-892.
- Menn, F.-M., Applegate, B. M. & Sayler, G. S. 1993. NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthracene to naphthoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1938-1942.
- Mergeay, M., Lejeune, P., Sadouk, A., Gerits, J., & Fabry, L. 1987. Shuttle transfer (or retro transfer) of chromosomal markers mediated by plasmid pULB113. *Mol. Gen. Genet.*, 209, 61-70.
- Mergey, M., Springael, D. & Top, E. 1990. Gene transfer in polluted soils. Kirjassa: J. C. Fry & M. J. Day (eds) Bacterial genetics in natural environments, pp.135-171. Chapman and Hall, London.

- Millar, A. J., Short, S. R., Chua, N. H. & Kay, S. A. 1992. A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell*, 4, 1075-1087.
- Moré, M. I., Herrick, J. B., Silva, M. C., Ghiorse, W. C. & Madsen, E. L. 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1572-1580.
- Morgan, J. A. W., Winstanley, C., Pickup, R. W., Jones, J. G. & Saunders, J. R. 1989. Direct phenotypic and genotypic detection of a recombinant pseudomonad population released into lake water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2537-2544.
- Morínigo, M. A., Cornax, R., Castro, D., Jimenez-Notaro, M., Romeo, P. & Borrego, J. J. 1990. Antibiotic resistance of *Salmonella* strains from natural polluted waters. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 297-302.
- Möller, A., Gustafsson, K. & Jansson, J. K. 1994. Specific monitoring by PCR amplification and bioluminescence of firefly luciferase gene-tagged bacteria added to environmental samples. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 15, 193-206.
- Möller, A., Norrby, A. M., Gustafsson, K. & Jansson, J. 1995. Luminometry and PCR-based monitoring of gene-tagged cyanobacteria in Baltic Sea microcosms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 129, 43-50.
- Nakai, C., Kagamiyama, H., Nozaki, M., Nakazawa, T., Inouye, S., Ebina, Y. & Nakazawa, A. 1983. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Biol. Chem.*, 258, 2923-2928.
- Nap, J.-P., Bijvoet, J., & Stiekema, W. J. 1992. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Transgen. Res.*, 1, 239-249.
- Nybroe, O., Christoffersen, K. & Riemann, B. 1992. Survival of *Bacillus licheniformis* in seawater model ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 252-259.
- Okamura, Y., Shoda, M. & Udaka, S. 1983. Activity and synthesis of α -galactosidase in various lactose utilizing bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 47, 133-134.
- Old, R. W. & Primrose, S. B. 1989. Principles of gene manipulation: an introduction to genetic engineering. Studies in Microbiology, vol 2. 4: s painos. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Oliver, R. P., Roberts, I. N., Harling, R., Kenyon, L., Punt, P. J., Dingemanse, M. A. & van den Hondel, C. A. A. M. J. J. 1987. Transformation of *Fulvia fulva*, a fungal pathogen of tomato, to hygromycin B resistance. *Curr. Gen.*, 12, 231-233.
- Oparka, K. J., Roberts, A. G., Prior, D. A. M., Chapman, S., Baulcombe, D. & Cruz, S. S. 1995. Imaging the green fluorescent proteins in plants-viruses carry the torch. *Protoplasma*, 189, 133-141.
- Orser, C., Staskawics, B. J., Panopoulos, N. J., Dahlbeck, D. & Lindow, S. E. 1985. Cloning and expression of bacteria ice nucleation genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 164, 359-366.
- van Overbeek, L., van Elsas, J., Trevors, J. & Starodub, M. 1990. Long-term survival of and plasmid stability in *Pseudomonas* and *Klebsiella* species and appearance of nonculturable cells in agricultural drainage water. *Microbial Ecology*, 19, 239-249.
- van Overbeek, L. S. & van Elsas, J. D. 1995. Root exudate-introduced promoter activity in *Pseudomonas fluorescens* mutants in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 890-898.
- Paton, G. I., Campbell, C. D., Glover, L. A. & Killham, K. 1995. Assessment of bioavailability of heavy metals using *lux* modified constructs of *Pseudomonas fluorescens*. *Let. Appl. Microbiol.*, 20, 52-56.
- Pedersen, J. C. & Leser, T. D. 1992. Survival of *Enterobacter cloacae* on leaves and in soil detected by immunofluorescence microscopy in comparison with selective plating. *Microb. Rel.*, 1, 95-102.
- Pemberton, J. M., Vincent, K. M. & Penfold, R. J. 1991. Cloning and heterologous expression of the violacein biosynthesis gene cluster from *Chromobacterium violaceum*. *Curr. Microbiol.*, 22, 355-358.
- Petering, J. E., Henschke, P. A. & Langridge, P. 1991. The *Escherichia coli* β -glucuronidase gene as a marker for *Saccharomyces* yeast strain identification. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 6-12.
- Pérez, J. L., Berrocal, C. I. & Berrocal, L. 1986. Evaluation of a commercial α -galactosidase test for the rapid and economical identification of *Escherichia coli*. *J. Appl. Bacteriol.*, 61, 541-545.
- Phillips-Jones, M. K. 1993. Bioluminescence (*lux*) expression in the anaerobe *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 106, 265-270.

- Pichard, S. L. & Paul, J. H. 1991. Detection of gene expression in genetically engineered microorganisms and natural phytoplankton populations in the marine environment by mRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1721-1727.
- Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X. & Simonet, P. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2717-2722.
- Pillai, S. D., Josephson, K. L., Bailey, R. L., Gerba, C. P. & Pepper, I. L. 1991. Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2283-2286.
- Pillai, S. D. & Pepper, I. L. 1991. Transposon Tn5 as an identifiable marker in rhizobia: survival and genetic stability of Tn5 mutant bean rhizobia under temperature stressed conditions in desert soils. *Microb. Ecol.*, 21, 21-33.
- Piskur, J., Mozina, S. S., Stenderup, J. & Pedersen, M. B. 1995. A mitochondrial molecular marker, ori-rep-ra, for differentiation of yeast species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2780-2782.
- Pitkääjärvi, 1996. Geenitekniikalla muunnettujen mikro-organismien ympäristövaikutukset. Suomen ympäristökeskuksen julkaisuja, käsikirjoitus.
- Porter, R. D. 1991. Conjugation. *Modern Microbial Genetics*, 157-189.
- Postma, J., van Elsas, J. D., Govaert, J. M. & van Veen, J. A. 1988. The dynamics of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil as determined by immunofluorescence and selective plating. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 53, 251-260.
- Powell, B. J., Purdy, K. J. & Bailey, M. J. 1993. Demonstration of *tra*⁺ plasmid activity in bacteria indigenous to the phyllosphere of sugar beet; gene transfer to a recombinant pseudomonad. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 12, 195-206.
- Prosser, J. I. 1994. Molecular marker systems for detection of genetically engineered microorganisms in the environment. *Microbiol.*, 140, 5-17.
- Ramos, J. L., Duque, E., & Ramos-Gonzales, M.-I. 1991. Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 260-266.
- Ramos-González, M.-I., Duque, E. & Ramos, J. L. 1991. Conjugal transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3020-3027.
- Rattay, E. A. S., Prosser, J. I., Killham, K. & Glover, L. A. 1990. Luminescence-based nonextracted technique for *in situ* detection of *Escherichia coli* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3368-3374.
- Rattay, E. A. S., Prosser, J. I., Glover, L. A. & Killham, K. 1995. Characterization of rhizosphere colonization by luminescent *Enterobacter cloacae* at the population and single-cell levels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2950-2957.
- Recobert, G., Picard, C., Normand, P. & Simonet, P. 1993. Kinetics of the persistence of chromosomal DNA from genetically engineered *Escherichia coli* introduced into soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 4289-4294.
- Roberts, I. N., Oliver, R. P., Punt, P. J. & van den Hondel, C. A. M. J. J. 1989. Expression of the *Escherichia coli* -glucuronidase gene in industrial and phytopathogenic filamentous fungi. *Curr. Gen.*, 15, 177-180.
- Robison, B. J. 1984. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 285-288.
- Romanowski, G., Lorenz, M. G. & Wackernagel, W. 1993. Use of polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3438-3446.
- Ross, P., O'Gara, F. & Condon, S. 1990. Thymidylate synthase gene from *Lactococcus lactis* as a genetic marker: an alternative to antibiotic resistance genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2164-2169.
- Roszbach, S., Kulpa, D., Roszbach, U. & De Bruijn, F. J. 1995. Molecular and genetic characterization of the rhizopine catabolism (*rocABRC*) genes of *Rhizobium meliloti* L5-30. *Mol. Gen. Genet.*, 245, 11-24.
- Rozsak, D. B. & Colwell, R. R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, 51, 365-379.
- Ruvkun, G. B. & Ausubel, F. M. 1981. A general model for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature*, 289, 85-88.

- Saint, C. P., Alexander, S., McClure, N. C. 1995. pTIM3, a plasmid delivery vector for a transposon-based inducible marker gene system in Gram-negative bacteria. *Plasmid*, 34, 165-174.
- Sambrook, J., Frisch, E. F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring harbor laboratory, N.Y.
- Saano, A. & Lindström, K. 1992. Detection of *Rhizobium galegae* from one-gram soil samples by non-radioactive DNA-DNA-hybridisation. *Soil. Biol. Biochem.*, 24, 969-977.
- Sandaa, R.-A. & Enger, Ö. 1994. Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4234-4238.
- Sandt, C. H. & Herson, D. S. 1991. Mobilization of the genetically engineered plasmid pHSV106 from *Escherichia coli* HB101(pHSV106) to *Enterobacter cloacae* in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 194-200.
- Sanseverino, J., Werner, C., Fleming, J., Applegate, B., King, J. M. H. & Sayler, G. S. 1993. Molecular diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in manufactured gas plant soils. *Biodegr.*, 4, 303-321.
- Saye, D. J., Ogunseitan, O. A., Sayler, G. S. & Miller, R. V. 1987. Potential for transduction of plasmids in a fresh water environment: effect of plasmid donor concentration and a natural microbial community on transduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 987-995.
- Saye, D. J., Ogunseitan, O. A., Sayler, G. S. & Miller, R. V. 1990. Transduction of linked chromosomal genes between *Pseudomonas aeruginosa* strains during incubation *in situ* in a fresh water habitat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 140-145.
- Sayler, G., & Layton, A. 1990. Environmental application of nucleic acid hybridization. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44, 625-648.
- Schmetterer, G., Wolk, C. P. & Elhai, J. 1986. Expression of luciferases from *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* in filamentous cyanobacteria. *J. Bacteriol.*, 167, 411-414.
- Schmidt, T. M., Kopecky, K. & Nealon, K. H. 1989. Bioluminescence of the insect pathogen *Xenorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2607-2612.
- Schmidt, F. R. J., Rosien, J. & Brokamp, A. 1991. The role of soil bacteria in risk assessment analysis, p. 207-215. Kirjassa: J. C. Fry & M. J. Day (ed), *Bacterial genetics in natural environments*. Chapman & Hall, London.
- cott, K. P. & Flint, H. J. 1995. Transfer of plasmids between strains of *Escherichia coli* under rumen conditions. *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 189-193.
- Selbitschka, W., Dresing, U., Hagen, M., Niemann, S. & Puehler, A. 1995. A biological containment system for *Rhizobium meliloti* based on the use of recombination-deficient (recA-) strains. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 16, 223-232.
- Shaw, J. J. & Kado, C. I. 1986. Development of a *Vibrio* bioluminescence gene-set to monitor phytopathogenic bacteria during the ongoing disease process in a non-disruptive manner. *Bio/Technol.*, 4, 560-564.
- Shaw, J. J., Dane, F., Geiger, D. & Kloepper, J. W. 1992. Use of bioluminescence for detection of genetically engineered microorganisms released into the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 267-273.
- Silcock, D. J., Waterhouse, R. N., Glover, L. A., Prosser, J. I. & Killham, K. 1992. Detection of a single genetically modified bacterial cell in soil by using charge coupled device-enhanced microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2444-2448.
- de Silva, A. A. & Hofer, E. 1993. Resistance to antibiotics and heavy metals in *Escherichia coli* from marine fish. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, 8, 1-11.
- Sivendra, R. & Tam, S. H. 1977. Pathogenicity of nonpigmented cultures of *Chromobacterium violaceum*. *J. Clin. Microbiol.*, 5, 514-516.
- Smalla, K., Cresswell, N.-S., Medonca-Hagler, L. C., Wolters, A. & van Elsas, J. D. 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 78-85.
- Snowmax Technologies, 1995. Snomax and environmental safety. Snomax Technologies, a division of genecor International, Inc. 1870 South Winton Road, 4 Cambridge Place, Rochester, Ny 14618.
- Sobecky, P. A., Schell, M. A., Moran, M. A. & Hodson, R. E. 1992. Adaptation of model genetically engineered microorganisms to lake water: growth rate enhancements and plasmid loss. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3630-3637.

- Sohaskey, C. D., Im, H. & Schauer, A. T. 1992. Construction and application of plasmid-based and transposon-based promoter-probe vectors for *Streptomyces* spp. that employ a *Vibrio harveyi* luciferase reporter cassette. *J. Bacteriol.*, 174, 367-376.
- Stachel, S., An, G., Flores, C. & Nester, E. 1985. A Tn3 *lacZ* transposon for the random generation of β -galactosidase gene fusions: application to the analysis of gene expression in *Agrobacterium*. *Embo J.*, 4, 891-898.
- Stahl, D. A. & Kane, M. D. 1992. Methods of microbial identification, tracking and monitoring of function. *Curr. Op. Biotechnol.*, 3, 244-252.
- Stearns, T. 1995. The green revolution. *Curr. Biol.*, 5, 262-264.
- Steffan, R. J. & Atlas, R. M. 1988. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2185-2191.
- Steffan, R. J., Breen, A., Atlas, R. M. & Saylor, G. S. 1989. Monitoring genetically engineered microorganisms in fresh water microcosms. *J. Ind. Microbiol.*, 4, 441-446.
- Steffan, R. J. & Atlas, R. M. 1991. Polymerase chain reaction: application in environmental microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, 45, 137-161.
- Stewart, G. & Williams, P. 1992. *Lux* genes and the applications of bacterial bioluminescence. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1289-1300.
- Sörensen, S. J. 1993. Transfer of plasmid RP4 from *Escherichia coli* K-12 to indigenous bacteria of seawater. *Microb. Rel.*, 2, 135-141.
- Taylor, L. D. & W. F. Burke, J. 1991. Construction of tracer plasmids for *Bacillus sphaericus* 1593 utilizing the *xylE* gene from *Pseudomonas putida*. *J. Invert. Path.*, 57, 66-70.
- Tebbe, C. C. & Vahjen, W. 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2657-2665.
- Tester, C. F. 1992. Influence of a genetically modified endophytic bacterium on composition and decomposition of corn residue. *Soil Biol. Biochem.*, 24, 1107-1112.
- Tholpe, I. S., Killham, K., Prosser, J. I. & Glover, L. A. 1993. Novel method for the study of the population dynamics of a genetically modified microorganism in the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Biol. Fert. Soils*, 15, 55-59.
- Thompson, C. J., Rao Movva, N., Tizard, R., Grameri, R., Davies, J. E., Lauwereys, M. & Botterman, J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.*, 6, 2519-2523.
- Thompson, I. P., Lilley, A. K., Ellis, R. J., Bramwell, P. A., & Bailey, M. J. 1995a. Survival, colonization and dispersal of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* SBW25 in the phytosphere of field grown sugar beet. *Bio/Technol.*, 13, 1493-1497.
- Thompson, I. P., Ellis, R. J., & Bailey, M. J. 1995b. Autecology of a genetically modified fluorescent pseudomonad on sugar beet. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17, 1-14.
- Tiedje, J. M., Colwell, R. K., Grossman, Y. L., Hodson, R. E., Lenski, R. E., Mack, R. N. & Regal, P. J. 1987. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology*, 70, 298-315.
- Tommerup, I. C., Barton, J. E., & O'Brien, P. A. 1995. Reliability of RAPD fingerprinting of three basidiomycete fungi, *Laccaria*, *Hydnangium* and *Rhizoctonia*. *Mycol. Res.*, 99, 179-186.
- Torsvik, V., Goksöyr, J., & Daae, F. L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 782-787.
- Trevors, J. T., van Elsas, J. D., van Overbeek, L. S. & Starodub, M.-E. 1990. Transport of a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* strain through a soil microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 401-408.
- Tsai, Y., & Olson, B. 1992. Detection of low numbers of bacterial cells in soil and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 754-757.
- Tseng, H.-C., Lin, C.-K., Hsu, B.-J., Leu, W.-M., Lee, Y.-H. W., Chiou, S.-J., Hu, N.-T. & Chen, C. W. 1990. The melanin operon of *Streptomyces antibioticus*: expression and use as a marker Gram-negative bacteria. *Gene*, 86, 123-128.
- Watson, R. J., Haitas-Crockett, C., Martin, T. & Heys, R. 1995. Detection of *Rhizobium meliloti* cells in field soil and nodules by polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.*, 41, 816-825.
- Webb, C. D., Decatur, A., Teleman, A. & Losick, R. 1995. Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 177, 5906-5911.

- de Weger, L. A., Dunbar, P., Mahafee, W. F., Lugtenberg, B. J. J. & Sayler, G. S. 1991. Use of luminescence markers to detect *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3641-3644.
- de Weger, L. A., van der Bij, A. J., Dekkers, L. C., Simons, M., Wijffelman, C. A. & Lugtenberg, B. J. J. 1995. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 17, 221-228.
- Wellwe, D. M. & Saettler, A. W. 1978. Rifampicin-resistant *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* and *Xanthomonas phaseoli*: tools for field study of bean blight bacteria. *Phytopathol.*, 68, 778-781.
- Wilson, K. J., Jefferson, R. A. & Hughes, S. G. 1992. The *Escherichia coli* gus operon: introduction and expression of the gus operon in *E. coli* and occurrence and use of GUS in other bacteria. GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression., S. R. Gallagher, ed., Academic Press, New York.
- Wilson, K. J., Sessitsch, A. & Akkermans, A. 1994. Molecular markers as tools to study the ecology of microorganisms. Kirjassa: Beyond the Biomass, K. Ritz, J. Dighton, and K. E. Giller, (ed.), British Society of Soil Science, Wiley-Sayce Publication.
- Wilson, K. J. 1995. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. *Soil Biol. Biochem.*, 27, 501-514.
- Winstanley, C., Morgan, J. A. W., Pickup, R. W., Jones, J. G. & Saunders, J. R. 1989. Differential regulation of λ p_L and p_R promoters by a cI repressor in a broad-host range thermoregulated plasmid marker system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 771-777.
- Winstanley, C., Morgan, J. A. W., Pickup, R. W. & Saunders, J. R. 1991. Use of a *xylE* marker gene to monitor survival of recombinant *Pseudomonas putida* populations in lake water by culture on nonselective media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1905-1913.
- Winstanley, C., Carter, J. P., Seaman, M., Morgan, J. A. W., Pickup, R. W. & Saunders, J. R. 1993. A comparison of the survival of stable and unstable chromosomally located *xylE* marker cassettes as an indicator of cell division within populations of *Pseudomonas putida* released into lake water and soil. *Microb. Rel.*, 2, 97-107.
- Wipat, A., Wellington, M. H. & Saunders, V. A. 1991. *Streptomyces* marker plasmids for monitoring survival and spread of *Streptomyces* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3322-3330.
- Woerse, C. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51, 221-271.
- Zaat, S. A. J., Slegtenhorts-Eegdeman, K., Tommassen, J., Geli, V., Wijffelman, C. A. & Lugtenberg, B. J. J. 1994. Construction of *phoE- α* , a novel PCR- and immunologically detectable marker gene for *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3965-3973.
- Zhang, Y. L. & Melcher, U. 1995. Tobacco mosaic virus encoding green fluorescent protein. *Phytopathol.*, 85, 1184.
- van Zijl, M., Wensvoort, G., den Kluyver, E., Hulst, M., van den Gulden, H., Gielkens, A., Berns, A. & Moormann, R. 1991. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J. Vir.*, 65, 2761-2765.

Kuvailulehti

Julkaisija	Suomen ympäristökeskus	Julkaisu-aika Toukokuu 1997						
Tekijä(t)	Katarina Björklöf							
Julkaisun nimi	Merkkigeenien käyttö geeniteknisesti muunnettujen mikro-organismien seurantaan ympäristössä							
Julkaisun osat/ muut saman projektin tuottamat julkaisut								
Tiivistelmä	<p>Tarkat tutkimukset luonnon kaltaisissa mallisysteemeissä ovat välttämättömiä, jotta odottamattomilta seurauksilta geeniteknisesti muunnettujen mikro-organismien luontoon lisäyksen yhteydessä voitaisiin välttyä. Ympäristöön lisättyjen mikro-organismien erottamista voidaan helpottaa leimaamalla ne erityisillä merkkigeeneillä.</p> <p>Useimmat kirjallisuudessa kuvatut merkkigeenit on kehitetty bakteerien seuranta varten. Merkkigeenin signaalin tulisi olla voimakas ja helposti mitattavissa. Sen on oltava myös ainutlaatuinen tutkittavassa ympäristössä eikä lisätty geenisekvenssi saisi haitata isäntäorganismia. Geenirakenne on oltava vakaa solussa eikä se saisi siirtyä muihin luonnossa esiintyviin mikro-organismeihin. Menetelmä, jolla merkkigeeni lisätään mikro-organismien perimään, vaikuttaa ratkaisevasti sen stabilisuuteen sekä sen kykyyn siirtyä muihin organismeihin luonnossa.</p> <p>Mikro-organismien perimän seuranta on tärkeää selvitettäessä, miten kauan lisätty organismi säilyy ympäristössä sekä tutkittaessa muunnettujen geenien kykyä siirtyä luonnon mikrobipopulaatioon. Käyttämällä DNA-koettimia tai PCR:ää voidaan merkkigeenin DNA-sekvenssiä seurata luonnossa. Tietoa muunnettujen mikro-organismien toiminnasta ympäristössä ei näillä menetelmillä kuitenkaan saada. Riskianalyysissä on toimintakykyisten solujen osuus ratkaiseva. Niitä voidaan seurata merkkigeeneillä, jotka tuottavat isäntäorganismissa uusia ominaisuuksia, jotka ovat helposti mitattavissa ja puuttuvat luonnonvaraisista mikro-organismeista. Se, mikä merkkigeeni toimii parhaiten missäkin systeemissä riippuu monista osatekijöistä ja siksi merkkigeeni olisikin valittava erikseen joka sovellutukseen.</p>							
Asiasanat	geenitekniikka, mikro-organismit, muunnetut organismit, merkkigeenit, ympäristövaikutusten arviointi, ympäristöriskit, seuranta							
Julkaisusarjan nimi ja numero	Suomen ympäristö 104							
Julkaisun teema	Ympäristönsuojelu							
Projektihankkeen nimi ja projektinumero								
Rahoittaja/ toimeksiantaja	Suomen ympäristökeskus							
Projektiryhmään kuuluvat organisaatiot	<table><tr><td>ISSN 1238-7312</td><td>ISBN 952-11-0130-X</td></tr><tr><td>Sivuja 56</td><td>Kieli suomi</td></tr><tr><td>Luottamuksellisuus julkinen</td><td>Hinta 45 mk</td></tr></table>		ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-0130-X	Sivuja 56	Kieli suomi	Luottamuksellisuus julkinen	Hinta 45 mk
ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-0130-X							
Sivuja 56	Kieli suomi							
Luottamuksellisuus julkinen	Hinta 45 mk							
Julkaisun myynti/ jakaja	Oy Edita Ab, julkaisumyynti, puh. (09) 566 0266 faksi (09) 566 0380	Suomen ympäristökeskus, asiakaspalvelu, puh. (09) 4030 0100, faksi (09) 4030 0190						
Julkaisun kustantaja	Suomen ympäristökeskus, PL 140, 00251 Helsinki							
Painopaikka ja -aika	Oy Edita Ab, Helsinki 1997							

Presentationssblad

Utgivare	Finlands miljöcentral	Datum Maj 1997						
Författare	Katarina Björklöf							
Publikationens titel	Användning av markörgener för uppföljning av gentekniskt modifierade mikroorganismer i miljön							
Publikationens delar/ andra publikationer inom samma projekt								
Sammandrag	<p>Noggranna undersökningar i naturliknande modellsystem är nödvändiga för att utesluta oväntade effekter av till naturen tillsatta gentekniskt modifierade mikroorganismer. De till miljön tillsatta mikroorganismerna kan märkas med en specifik markörgen för att underlätta urskiljningen.</p> <p>De flesta i litteraturen beskrivna markörgenerna har utvecklats för kontroll av bakterier. Markörgenens signal bör vara stark och lätt att mäta. Den skall vara unik i den miljö som undersöks och den tillsatta gensekvensen får inte vara en börda för värdorganismen. Genkonstruktionen bör vara stabil i cellen och inte överförs till andra i naturen förekommande mikroorganismer. Den tillsatta gensekvensens stabilitet i cellen och dess förmåga att spridas till andra organismer i naturen påverkas väsentligt av den metod med vilken markörgenen insätts i mikroorganismens arvsmaterial.</p> <p>Uppföljning av mikroorganismens arvsmaterial är väsentlig för att klargöra hur länge den tillsatta organismen existerar i miljön och huruvida de modifierade generna kan överföras till den naturliga mikrobiopopulationen. Markörgenens DNA-sekvens kan spåras i miljön med hjälp av DNA sonder och PCR. Dessa metoder ger inte information om de modifierade mikroorganismernas aktivitet i miljön. De aktiva cellernas andel är av avgörande betydelse i riskanalys av gentekniskt modifierade mikroorganismer. Dessa kan uppföljas med markörgener vilka ger värdorganismen nya mätbara egenskaper som de naturliga mikroorganismerna saknar. Vilken markörgen som lämpar sig bäst för studier i ett visst system beror på många delfaktorer, och den bör därför väljas skilt för sig vid varje tillämpning.</p>							
Nyckelord	genteknik, mikroorganismer, modifierade organismer, markörgener, miljökonsekvensbedömning, miljörisker, kontroll							
Publikationsserie och nummer	Miljön i Finland 104							
Publikationens tema	miljövård							
Projektets namn och nummer								
Finansiär/ uppdragsgivare	Finlands Miljöcentral							
Organisationer i projektgruppen	<table><tr><td>ISSN 1238-7312</td><td>ISBN 952-11-0130-X</td></tr><tr><td>Sidantal 56</td><td>Språk finska</td></tr><tr><td>Offentlighet offentlig</td><td>Pris 45 mk</td></tr></table>		ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-0130-X	Sidantal 56	Språk finska	Offentlighet offentlig	Pris 45 mk
ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-0130-X							
Sidantal 56	Språk finska							
Offentlighet offentlig	Pris 45 mk							
Beställningar/ distribution	<table><tr><td>Edita Ab tel (09) 566 0266 telefax (09) 566 0380</td><td>Finlands miljöcentral Kundservice, tel. (09) 4030 0100 telefax (09) 4030 0100</td></tr></table>		Edita Ab tel (09) 566 0266 telefax (09) 566 0380	Finlands miljöcentral Kundservice, tel. (09) 4030 0100 telefax (09) 4030 0100				
Edita Ab tel (09) 566 0266 telefax (09) 566 0380	Finlands miljöcentral Kundservice, tel. (09) 4030 0100 telefax (09) 4030 0100							
Förläggare	Finlands miljöcentral, PO Box 140, FIN-00251 Helsingfors, Finland							
Tryckeri/ tryckningsort och -år	Edita Ab, Helsingfors 1997							

Documentation page

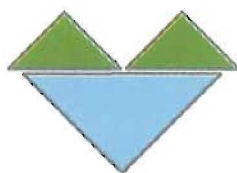
Publisher	Finnish Environment Institute	Date May 1997						
Author(s)	Katarina Björklöf							
Title of publication	Marker genes used for detection of genetically modified micro-organisms in the environment							
Parts of publication/ other project publications								
Abstract	<p>To exclude unexpected effects of genetically modified micro-organisms added to the environment, detailed studies have to be performed in model systems simulating the environment. To detect added micro-organisms in the environment the organisms can be labelled with a specific marker gene.</p> <p>Most marker genes described in the literature have been developed for detection of bacteria. The signal of the marker gene has to be strong and easy to detect. It should be unique in the environment studied and the added gene sequence should not be a burden for the host. The gene construct should be stable in the cell and not be transferable to other micro-organisms present in nature.</p> <p>Following up the genotype is important to establish how long the added micro-organism exists in the environment and whether the modified genes are transferable to the native microbial population. The DNA- sequence of the marker gene can be detected in the environment by using DNA probes or PCR. No conclusion about the activity of the modified micro-organisms can be made by these methods. The activity of the cells is however of crucial importance for the risk assessment of genetically modified micro-organisms. The active cells can be followed by using marker genes that give the host organisms new measurable characters that the native micro-organisms lack. Which marker gene should be used in different systems depends on many factors and should therefore be chosen separately in every application.</p>							
Keywords	gene technology, micro-organisms, modified organisms, marker genes, environment impact assessment, environmental risks, monitoring							
Publication series and number	The Finnish Environment 104							
Theme of publication	Environmental Protection							
Project name and number, if any								
Financier/ commissioner								
Project organization	<table><tr><td>ISSN 1238-7312</td><td>ISBN 952-11-0130-X</td></tr><tr><td>No. of page 56</td><td>Language finnish</td></tr><tr><td>Restrictions public</td><td>Price 45 FMK</td></tr></table>		ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-0130-X	No. of page 56	Language finnish	Restrictions public	Price 45 FMK
ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-0130-X							
No. of page 56	Language finnish							
Restrictions public	Price 45 FMK							
For sale at/ distributor	Edita, tel. +358 9 566 0266 telefax + 358 9 566 0380	Finnish Environment Institute, Customer Service, tel. +358 9 4030 0100 telefax +358 9 4030 0190						
Financier of publication	Finnish Environment Institute, Po Box 140, FIN-00251 Helsinki, Finland							
Printing place and year	Edita Ltd, Helsinki 1997							

SUOMEN YMPÄRISTÖ

1. Järvinen, Mika: Ympäristöystävä vai vapaamatkustaja? Suomen ympäristökeskus.
2. Saukkonen, Sari & Kenttämies, Kaarle (toim.): Metsätalouden vesistövaikutukset ja niiden torjunta. METVE-projektin loppuraportti. Suomen ympäristökeskus.
3. Kosola, Marjaleena; Miettinen, Pauli & Laikari, Hannu: Ympäristötalous - ajankohtaisia tutkimus- ja kehittämistehtäviä. Suomen ympäristökeskus.
4. Riihimäki, Juha; Yrjänä, Timo & van der Meer, Olli: Lyhytaikaisäädön elinympäristövaikutusten arviointimenetelmät. Suomen ympäristökeskus.
5. Blomster, Jaana: Ravinnekuoormituksen vaikutus rantavyöhykkeen leväyhteisöihin ja vaikutusten arvioinnissa käytetyt menetelmät. Suomen ympäristökeskus.
6. Soveri, Jouko & Peltonen Kimmo: Lumen ainepitoisuudet ja talviaikainen laskeuma Suomessa vuosina 1976–1993. Suomen ympäristökeskus.
7. Britschgi, Ritva: Pohjavesien suojelun ja kiviaineshuollon yhteensovittaminen. Suomen ympäristökeskus.
8. Holmberg, Maria; Hutka, Veijo; Laitinen, Timo; Maunula, Markku & Schultz, Titta: Happamien sulfaattimaiden ionivirtausten mallintaminen. Suomen ympäristökeskus.
9. Hagan, Harri : Lähiökorjaamisen arkkitehtoniset vaikutukset. Ympäristöministeriö.
10. Kylä-Setälä, Annamajja & Assmuth, Timo: Suomen maaperän tila, kuormitus ja suojelu. Suomen ympäristökeskus.
11. Hyvärinen, Pekka; Vehanen, Teppo; Tigunov, Sergei; Mäki-Petäys, Aki & Konttinen, Erja: Kalojen vaellus Inarijärvestä Paatsjokeen. Suomen ympäristökeskus.
12. Palveluasumistyöryhmä: Palveluasumistyöryhmän muistio. Ympäristöministeriö.
13. Lepistö, Liisa & Pietiläinen, Olli-Pekka: Kasviplanktonin määrän ja koostumuksen muutokset Lokassa, Porttipahdassa ja Kemijärvessä. Suomen ympäristökeskus.
14. Kaukonieni, Tapani & Tikkanen, Hannu: Kulttuurimaiseman kasvot, Nivalan Kotila. Ympäristöministeriö.
15. Korhonen, Pekka & Virtanen, Markku: Elohopean kertymisen kuvaaminen matemaattisella mallilla. Suomen ympäristökeskus.
16. Virkkala, Raimo: Metsien suojelualueverkon rakenne ja tarpeet – ekologinen lähestymistapa. Suomen ympäristökeskus.
17. Tana, Jukka & Lehtinen, Karl-Johan: The aquatic environmental impact of pulping and bleaching operations – an overview. Suomen ympäristökeskus.
18. Nippala, Eero & Jaakkonen, Liisa: Asuinkerrostalojen kuntoarviot. Ympäristöministeriö.
19. Karjalainen, Heli; Seppälä, Satu & Walls, Mari: Ammoniumtyypen merkitys kasviplanktonituotantoa säätelevänä tekijänä – esimerkkinä Kallavesi. Pohjois-Savon ympäristökeskus.
20. Lepistö, Liisa; Cronberg, Gertrud & Tikkanen, Toini: Records of some algal species, Nordic Phytoplankton Workshop 7–10.6.1994. Suomen ympäristökeskus.
21. Pesonen, Reijo: Vuorovaikutteista suunnittelua Jyväskylän Kekkolassa. Ympäristöministeriö.
22. Rouhiainen, Hanna: Rakentamisen ja kiinteistönmuodostuksen ohjaaminen haja-asutusalueilla. Ympäristöministeriö.
23. Heikkilä, Mikko; Karppinen, Seppo & Santasalo, Tuomas: Suomalaisia kävelykeskuksia. Ympäristöministeriö.
24. Kiviranta, Samuel, Summala, Mika & Hänninen Pekka: Työpaikka-alueiden käytön tehostaminen. Yhteenvetoraportti. Ympäristöministeriö.
25. Marttinen, Kari: Hallintosopimukset ympäristöpolitiikan ohjauskeinona. Ympäristöministeriö.
26. Hammar, Taina; Huovila, Juhani; Lahti, Erkki; Manninen, Pertti; Oksman, Heikki; Punju, Pirjo & Taipainen, Irmeli: Pyödyksiä limoittavan *Hyalothea dissiliens* -koristelevän runsastumisesta ja ja sen syistä. Pohjois-Savon ympäristökeskus.
27. 5th Annual Report 1996, International Co-operative Programme on Integrated Monitoring of Air Pollution Effects on Ecosystems, UN ECE Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution. Suomen ympäristökeskus.
28. Sojakka, Pekka: Perifytonmenetelmien käyttökelpoisuus kalankasvatuksen vesistövaikutusten arvioinnissa. Etelä-Savon ympäristökeskus.
29. Kuusamotyöryhmä: Kuusamon yhteismetsän vanhojen metsien luonnonarvojen säilyttäminen ja yhteismetsän toiminnan turvaaminen. Ympäristöministeriö.
30. Vanhojen metsien suojelutyöryhmä: Vanhojen metsien suojelu Pohjois-Suomessa – Vanhojen metsien suojelutyöryhmän osamietintö III. Ympäristöministeriö.
31. Pirinen, Auli; Salminen, Markku; Speeti, Tero: Asuinkerrostalon huoltokirja esimerkkikohteeseen. Ympäristöministeriö.
32. Pirinen, Auli; Salminen, Markku; Speeti, Tero: Asuintalon huoltokirjan laadinta. Ympäristöministeriö.
33. Mukherjee, Arun B: The use and release of silver in Finland. Suomen ympäristökeskus.
34. Laine, Anne; Sutela, Tapio; Heikkinen, Kaisa; Karvonen, Keijo; Huhta, Arto; Muotka, Timo & Lappalainen, Antti: Turvetuotannon vaikutukset koskikaloihin ja niiden elinympäristöön. Pohjois-Pohjanmaan ympäristökeskus.
35. Savolainen, Mirja; Kaasinen, Aulis; Heikkinen, Kaisa; Ihme, Raimo; Kämä, Tarmo & Alasaarela, Erkki: Turvetuotannon vesiensuojeluvaihtoehtojen tapauskohtainen vertailu. Pohjois-Pohjanmaan ympäristökeskus.
36. Alanen, Jouni & Saastamoinen, Salla: Euroopan Unioniin tuotavat rakennustuotteet, vaatimusten mukaisuuden osoittaminen. Ympäristöministeriö.

37. Pohjois-Suomen vanhojen metsien suojelun kompensatiotyöryhmän mietintö. Ympäristöministeriö.
38. Tanskanen, Juha-Heikki: Syntypaikkalajitteluun perustuvan yhdyskuntajätehuollon tarkastelu. Suomen ympäristökeskus.
39. Malaska, Pentti; Luukkanen, Jyrki; Vehmas, Jarmo & Kaivo-oja, Jari: Ympäristöperusteinen energiaverotus – pohjoismaisia vertailuja ja suomalaisen keskustelun arviointia. Ympäristöministeriö.
40. Ilén, Pekka; Rautavuori, Leena & Salminen, Eero: Uukuniemen kirkonkylän kulttuurimaiseman hoitosuunnitelma. Ympäristöministeriö.
41. Ympäristöministeriö: Kaavoitustoimen seuranta. Ympäristöministeriö.
42. Outila, Tarja: Keivitsan kaivoshanke – kaavoitusjärjestelmät ja luonnonsuojelu. Ympäristöministeriö.
43. Lankinen, Markku: Asuntorakentamisen ennakointi. Ympäristöministeriö.
44. Tanskanen, Heikki; Walls, Mari; Maripuu, Lea & Tuhkanen, Tuula: Otsonoinnin ja otsoni/vetyperoksidikäsittelyjen vaikutus kloorittoman (ECF) metsäteollisuuden kuorimovesien ekotokisuuteen. Pohjois-Savon ympäristökeskus.
45. Huttunen, Leena; Rönkä, Esa & Matinvesi, Jukka: Erilaisten viljely- ja lannoitustapojen vaikutus pohjaveden laatuun – lysimetritutkimus karkealla hietamaalla. Suomen ympäristökeskus.
46. Paulus, Ilkka: Romaniväestön asuntotilanne 1990-luvun puolivälissä. Ympäristöministeriö.
47. Lähiötyöryhmä: Monitoimijainen lähiöuudistus. Ympäristöministeriö.
48. Tarkomaa, Jari: Asumisoikeusasunnot- ja asukkaat. Ympäristöministeriö.
49. Saarenheimo, Ulla & von Hertzen, Heikki, S: Asunnottomuus väheni Suomessa. Ympäristöministeriö.
50. Myllymäki, Pauliina: Raadonin ja uraanin poisto kalliopohjavedestä. Suomen ympäristökeskus.
51. Salo, Simo; Ekholm, Petri & Knuuttila, Seppo : A comparison of methods for nutrient source apportionment in Nordic Rivers. Suomen ympäristökeskus.
52. Paukkunen, Marika & Vartia, Pauli: Selvitys ympäristövaikutusten arviointimenettelyn kokemuksesta 1994–1995. Ympäristöministeriö.
53. Haimi, Jari & Salminen, Janne: Kemikaalien vaikutukset terrestrisessä ympäristössä – tutkimus- ja testimenetelmien kehittäminen erityisesti suomalaiselle maaperälle. Suomen ympäristökeskus.
54. Rintala, Jari: Soranottoalueiden jälkihoito – pintarakennemateriaalit suojaverhouksessa. Suomen ympäristökeskus.
55. Britschgi, Ritva & Gustafsson, Juhani: Suomen luokitellut pohjavesialueet. Helsinki. Suomen ympäristökeskus.
56. Heli Vuoksima: Lasipakkausten kierrätysjärjestelmät ja niiden kustannukset Suomessa - keräysjärjestelmien kustannustehokkuusvertailu. Ympäristöministeriö.
57. Nysten; Hänninen & Niemi: Tiesuolan pohjavesihaittojen vaikutuksista ja torjuntakeinoista. Suomen ympäristökeskus.
58. Hellsten, Seppo; Marttunen, Mika; Puro, Annukka; Huttula, Erkki; Nenonen, Marjaleena & Bergman, Tarja: Inarijärven tila ja siihen vaikuttavat tekijät. Lapin ympäristökeskus.
59. Kettunen, Aija: Kuntien ympäristöhallinnon asema ja tila; faktaa ja käsityksiä. Ympäristöministeriö.
60. Uusien vuokrasuhteiden vuokrat huhtikuussa 1996. Ympäristöministeriö.
61. Pehkonen, Pertti & Jansson, Johanna: Viheralan tutkimus- ja kehittämistyö - tilannekatsaus. Ympäristöministeriö.
62. Södeman, Guy & Lundsten, Karl-Erik: Valtakunnallisen yöperhosseurannan 3. vuosiraportti. Suomen ympäristökeskus.
63. Fagerroos, Jan & Rosenström, Ulla: Trends in the Finnish environment - environmental indicators for the 1997 OECD environmental performance review of Finland. Ympäristöministeriö.
64. Haarni, Tuukka & Vartiainen, Perttu: Kaupunkiverkostoituminen Suomessa. Ympäristöministeriö.
65. Nyman; Halmetoja; Pohtamaa ym: M/S Eiran öljyvahingon pitkäaikaisvaikutukset Merenkurkussa. Länsi-Suomen ympäristökeskus.
66. Sinisalmi, Tuomo (toim.): Vesivoimalaitosten lyhytaikaisäädön vaikutustutkimukset. Pohjois-Pohjanmaan ympäristökeskus.
67. Kananoja, Tapio: Kymen läänin kallioperän suojelu- ja opetuskohteita. Ympäristöministeriö.
68. Keppo, Eeva: Vaasan läänin kulttuuriympäristöohjelma.
69. Hyvärinen, Veli (toim.): Hydrologinen vuosikirja 1993. Hydrological yearbook 1993. Suomen ympäristökeskus.
70. Savolainen, Matti: Omakotitalojen kustannuslaskentajärjestelmä. Ympäristöministeriö.
71. Nysten, Taina; Suokko, Tuulikki & Tarvainen, Timo: Ympäristögeologian sovelluksia – GTK, SYKE ympäristötutkimusseminaari 1.10.1996. Suomen ympäristökeskus.
72. Kempainen, Eija: Suomen uhanalaiset lajit – Ketonukki (*Androsace septentrionalis*). Suomen ympäristökeskus.
73. Halonen, Pekka; Tuukka, Eeva; Puolasmaa, Arto; Kaipainen, Heidi: Suomen uhanalaiset lajit – Pohjanhyttelöjäkälä (*Collema curtisporum*) lännenhyttelöjäkälä (*Collema nigrescens*) risahyttelöjäkälä (*Collema multipartitum*). Suomen ympäristökeskus.
74. Kempainen, Eija & Karling, Marita: Suomen uhanalaiset lajit – Koirankieli (*Cynoglossum officinale*). Suomen ympäristökeskus.
75. Kosonen, Lasse; Kaipainen, Heidi & Kempainen, Eija: Suomen uhanalaiset lajit – Mäkiorvokki (*Viola collina*). Suomen ympäristökeskus.

76. Pykälä, Juha & Vuorinen Soili: Suomen uhanalaiset lajit – Punavalkku (*Cephalanthera rubra*). Suomen ympäristökeskus.
77. Pykälä, Juha & Vuorinen Soili: Suomen uhanalaiset lajit – Vuorikuisma (*Hypericum montanum*). Suomen ympäristökeskus.
78. Kaipainen, Heidi; Kemppainen, Eija & Bonn; Thomas: Suomen uhanalaiset lajit – Tähkähelmikkä (*Melica ciliata*). Suomen ympäristökeskus.
79. Joensuu, Ilona; Vuori, Kari-Matti & Nieminen, Mari: Vesistöarakentamisen ja lyhytaikaissäännöstelyn vaikutus Perhonjoen koskien eliöyhteisöihin. Keski-Pohjanmaan ympäristökeskus.
80. Hassi, Laura: Ihanteita ja ohjausvälineitä - asumisen tuen kohdentuminen vuonna 1993. Ympäristöministeriö.
81. Grönroos, Juha; Rekolainen, Seppo & Nikander, Antero: Maatalouden ympäristötuen toimenpiteiden toteutuminen vuonna 1995. Suomen ympäristökeskus.
82. Leskelä, Ari & Hudd, Richard: Lohi- ja taimenmerkinnät. Länsi-Suomen ympäristökeskus.
83. Hudd, Richard; Kjellman, Jakob & Leskelä, Ari: Kyröjoen suiston poikastuotanto ja kalakannat. Länsi-Suomen ympäristökeskus.
84. Kopra, Pekka: Kaavatalouden näkökohtia päättäjille. Ympäristöministeriö.
85. Uuskallio, Irma (toim.): National overview on distressed urban areas in Finland. Ympäristöministeriö.
86. Peltola, Taru: Yrityn muuttuva toimintaympäristö hallinnon haasteen – Hämeen ympäristökeskuksen pk-yritysprojektin loppuraportti. Hämeen ympäristökeskus.
87. Luostarinen, Matti; Yli-Viikari, Anja (toim.): Maaseudun kulttuurimaisemat. Suomen ympäristökeskus, Maatalouden tutkimuskeskus.
88. Airamo, Raimo & Permanto, Timo: Yleiskaavoitus ja vaikutusten arviointi. Ympäristöministeriö.
89. Seppälä, Jyri & Jouttijärvi, Timo (toim.): Metsäteollisuus ja ympäristö. Suomen ympäristökeskus.
90. Siistonen, Pasi: Jokioisten kulttuuriympäristöohjelma. Ympäristöministeriö.
91. Kilpailuttaminen valtion tukemassa asuntotuotannossa – Työryhmän mietintö. Ympäristöministeriö.
92. Malaska, Pentti; Luukkanen, Jyrki; Vehmas, Jarmo & Kaivo-oja, Jari: Environment – Based energy taxation in the Nordic countries. Comparisins by energy source and a review of the Finnish discussion. Ympäristöministeriö.
93. Luoma, Juha: Muuttuva ihminen – muuttuva asunto. Ympäristöministeriö.
94. Jauhiainen, Tapani; Vuorinen, Heikki; Heinonen-Guzejev, Marja & Paikkala, Sirkka-Liisa: Ympäristömelun vaikutukset. Ympäristöministeriö.
95. Lind, Tuula & Pietala, Jorma: Kotipalveluja käyttävien vanhusten kauppamatkat Lahdessa. Ympäristöministeriö.
96. The Finnish background report for the EC documentation of best available techniques for pulp and paper industry. Ympäristöministeriö.
97. Alanen, Tommi & Ratia, Pasi: Asuntorakentamisen työllisyysvaikutukset. Ympäristöministeriö.
98. Pitkälampi, Jyrki: Geenitekniikalla muunnettujen mikro-organismien ympäristövaikutukset. Suomen ympäristökeskus.
99. Viinikainen, Tytti: Yhteiskuntatieteellinen ympäristötutkimus Suomessa. – Katsaus tutkimusaloihin ja kirjallisuuteen. Suomen ympäristökeskus.
100. Pietiläinen, Olli-Pekka & Pirinen, Marja: Typpi- ja fosforikuormituksen vaikutus päällysläpästön kasvuun Kymijoen. Suomen ympäristökeskus.
101. Maataloudesta peräisin olevien nitraattien vesiin pääsyn rajoittamista koskeva valtioneuvoston päätösehdotus. – Työryhmän mietintö. Ympäristöministeriö.
102. Suurmyymälätyöryhmän mietintö. Ympäristöministeriö.
103. Kilpi, Mikael & Asanti, Timo (toim.): Saaristolinnuston suojelun nykytila Suomen rannikoilla. Suomen ympäristökeskus.

**YMPÄRISTÖN-
SUOJELU**

Merkkigeenien käyttö geeniteknisesti muunnettujen mikro-organismien seurantaan ympäristössä

Geeniteknisesti muunnetut mikro-organismit (GMM) tarjoavat uusia sovellutuksia maataloudessa ja ympäristön suojelussa. Näissä sovellutuksissa eläviä GMM:ja levitetään luontoon suorittamaan jotakin tarkkaan määriteltyä tehtävää. Ennen GMM:en käyttöä ympäristössä tulee kuitenkin mallisysteemeissä arvioida tarkkaan ympäristölle tai ihmisen terveydelle mahdollisesti aiheutuvat riskit. Geeniteknisesti muunnettujen mikro-organismien seuranta ympäristössä voidaan helpottaa leimaamalla ne erityisillä merkkigeeneillä.

Tämä yleistajuinen kirjallisuuskatsaus käsittelee uusimpia tutkimustuloksia merkkigeenien käytöstä mikro-organismien ympäristöseurannassa. Julkaisun alkuosa tarkastelee yleisesti merkkigeenien ominaisuuksia, jotka ovat erityisen tärkeitä seurannassa. Pääosa katsauksesta kuvaa käytettyjen merkkigeenien seurantamenetelmiä. Niiden edut ja haitat esitetään esimerkinomaisesti kirjallisuudessa esiintyvien tutkimustulosten pohjalta. Tekstissä käytettyjä ammattisanoja selitetään sanasto-osassa. Julkaisu sisältää myös ruotsinkielisen yhteenvedon.

ISBN 952-11-0130-X

ISSN 1238-7312

Myynti: Suomen ympäristökeskuksen asiakaspalvelu,
PL 140, 00251 Helsinki
puh. (09) 4030 0100, faksi (09) 4030 0190 ja
Oy Edita Ab

Oy EDITA Ab
PL 800, 00043 EDITA, vaihde (09) 566 01
ASIAKASPALVELU
puh. (09) 566 0266, telefax (09) 566 0380
EDITA-KIRJAKAUPAT HELSINGISSÄ
Annankatu 44, puh. (09) 566 0566
Eteläesplanadi 4, puh. (09) 662 801



9 789521 101304